

VALÉRIA ABRANTES PINHEIRO CARVALHO

**MATRIZ DENTINÁRIA DESMINERALIZADA HOMÓGENA
LIOFILIZADA APLICADA NA REPARAÇÃO ÓSSEA:
*ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Doutor em Biologia
Buco-Dental.

**PIRACICABA
2004**

VALÉRIA ABRANTES PINHEIRO CARVALHO

**MATRIZ DENTINÁRIA DESMINERALIZADA HOMÓGENA
LIOFILIZADA APLICADA NA REPARAÇÃO ÓSSEA:
*ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Biologia Buco-Dental.

Orientadora: Profa. Dra. Darcy de Oliveira Tosello

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão

Profa. Dra. Darcy de Oliveira Tosello

Prof. Dr. Márcio Moraes

Profa. Dra. Mônica Fernandes Gomes

Prof. Dr. Sérgio Augusto Catanzaro-Guimarães

**PIRACICABA
2004**

Ficha Catalográfica

C253m Carvalho, Valéria Abrantes Pinheiro.
Matriz dentinária desmineralizada homogênea liofilizada aplicada na reparação óssea: análise histomorfométrica. / Valéria Abrantes Pinheiro Carvalho. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2004.
xv, 100p. : il.

Orientadora : Prof^a Dr^a Darcy de Oliveira Tosello.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Coelho. 2. Mandíbula. 3. Ossos – Regeneração. I. Tosello, Darcy de Oliveira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

*“Ao contrário do ouro e do barro.
O verdadeiro amor, dividido, não diminui.”*

Martin Luther King

*Dedico este trabalho ao meu marido
Roberto, pelo seu altruísmo, compreensão,
dedicação, presença constante nos momentos
difíceis e colaboração incondicional na
conquista de mais este objetivo em nossas vidas.*

Com todo o meu amor !!!

*E às minhas filhas Livia e Júlia,
presentes de Deus em minha vida, pelo carinho
com que perdoaram meus momentos de
ausência...*

Com amor,

Minha eterna gratidão !!!

AGRADECIMENTOS

*Há dias em que temos a sensação de que chegamos ao fim da linha.
Não conseguimos vislumbrar uma saída viável para os problemas que
surtem em grande quantidade.*

Porém, as dores mais amargas, passam...

Tudo passa...

A ilusão fascina, mas se desvanece...

O poder apaixona, entretanto, transita de pessoa.

O prazer alegre, todavia é efêmero.

A glória terrestre exalta e desaparece.

O triunfador de hoje, passa, mais tarde, vencido...

Tudo, nesta vida, tem um propósito...

A dor aflige, mas também passa.

A carência aturde, porém, um dia se preenche.

A debilidade física deprime, todavia, liberta das paixões.

O silêncio que entristece, leva à meditação que felicita.

A submissão aflige, entretanto fortalece o caráter.

O fracasso espezinha, ao mesmo tempo ensina o homem a conquistar-se.

A situação muda, como mudam as estações...

*O verão brinca de esconde-esconde com a brisa morna, mas cede lugar ao
outono, que espalha suas tintas sobre a folhagem.*

O inverno chega e, sem pedir licença, congela a brisa e derruba as folhas.

Tudo parece sem vida, sem cor, sem perfume...

Será o fim? Não!

Todas as dores terminam.

Aguardemos que o tempo, com suas mãos cheias de bálsamo, traga o alívio.

*A ação do tempo é infalível, e nos guia suavemente pelo caminho certo,
aliviando nossas dores, assim como a brisa leve abrande o calor do verão.*

*Mais depressa do que se supõe, teremos a resposta, na consolação de que
necessitamos.*

Por tudo isso, resistamos... E confiemos nesse abençoado aliado chamado

Deus !!!.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, nas pessoas do Exmo. Sr. Diretor Thales Rocha de Mattos Filho e da coordenadora do programa de Pós-Graduação de Biologia Buco-Dental, Profa. Dra. Silvana Pereira Barros, pela oportunidade e apoio técnico-científico na realização deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, - Campus de São José dos Campos, nas pessoas do Exmo. Sr. Diretor Paulo Villela Santos Junior e do Exmo. Sr. Vice-Diretor José Roberto Rodrigues por tornarem viável meu aperfeiçoamento acadêmico, por meio do intercâmbio interinstitucional.

Ao Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, nas pessoas do Prof. Dr. Luis Eduardo Blumer Rosa e da Profa. Adj. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante, respectivamente chefe e vice-chefe do Departamento, por viabilizarem meu licenciamento parcial das atividades como docente para freqüentar o curso de Pós-Graduação.

“Chegamos exatamente onde precisamos chegar, porque a mão de Deus sempre guia aquele que segue seu caminho com fé.”

Richard Bach

À orientadora e amiga,

Professora Associada Darcy de Oliveira Tosello, do Curso de Pós-Graduação de Biologia Buco-Dental (FOP-UNICAMP)

Pela confiança em mim depositada, que permitiu meu ingresso e permanência, nesta faculdade, como aluna de pós-graduação.

Pela competência apresentada em suas atribuições na carreira acadêmica.

Pela presença sempre alegre, espontânea, otimista e compreensiva, me encorajando sempre a crer num futuro melhor e a prosseguir com afinco em minha carreira acadêmica.

Por acreditar em meu caráter e idoneidade, oferecendo prontamente os suportes moral e profissional necessários à realização deste trabalho.

Por priorizar sempre o lado humano no relacionamento com seus orientados, colocando, acima de tudo, seus sentimentos, aspirações, sonhos e emoções.

Por me ensinar a ter o bom senso de ouvir sempre e calar-me no momento propício para que a coerência e o equilíbrio caracterizem minhas atitudes.

Minha amizade, respeito e gratidão.

“A felicidade, às vezes, é uma benção, mas geralmente é uma conquista.”

Paulo Coelho

À orientadora e amiga,

*Professora Doutora Adriana Aigotti Haberbeck Brandão,
responsável pela disciplina de Patologia Geral da Faculdade de
Odontologia de São José dos Campos - UNESP.*

*Por me mostrar com seu desprendimento, alegria e paz de espírito o
quanto a vida pode ser vivida com mais simplicidade.*

*Pela sua competência e conhecimentos técnico-científicos, que tanto
colaboraram para a execução deste trabalho.*

*Pela atenção com que sempre me acolheu, colaborando
incondicionalmente em todas as etapas de minha pesquisa.*

*Por me receber carinhosamente como sua orientada, na finalização de
meu trabalho de tese, na FOSJC-UNESP.*

*Pela presença leal e constante em momentos difíceis de minha carreira
acadêmica.*

Minha amizade e reconhecimento.

“Nenhum homem é uma ilha.

Para combater o Bom Combate, precisamos de ajuda.”

Martin Luther King

À colaboradora e amiga,

Professora Assistente Maria Nadir Gasparoto Mancini, responsável pela disciplina de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP.

Por exemplificar o sentido das palavras coerência e trabalho na busca do aperfeiçoamento profissional.

Pela dedicação, convicção em suas idéias e por seu amor à carreira que abraçou.

Pela colaboração na elaboração e execução das etapas laboratoriais que permitiram a realização desta pesquisa.

Pela atenção com que sempre me acolheu nos momentos de incertezas...

Pela consideração e respeito com que me acolheu em seu ambiente de trabalho e pela agradável convivência diária.

E, sobretudo, pelos momentos difíceis, onde aprendemos a aparar as arestas, olhar para dentro de nós mesmos e construir, pouco a pouco, o verdadeiro respeito e amizade!

Meu sincero e leal reconhecimento.

*“As pessoas sempre chegam na hora exata,
nos lugares onde estão sendo esperadas.”*

Richard Bach

À companheira de trabalho e amiga,

*Professora Doutora Rosilene Fernandes da Rocha, responsável pela
disciplina de Farmacologia e coordenadora do Programa de Pós-
Graduação em Biopatologia Bucal da Faculdade de Odontologia de São
José dos Campos - UNESP.*

*Pelo exemplo de responsabilidade, trabalho, integridade e
competência em suas atribuições profissionais.*

*Pela confiança em mim depositada me acolhendo, sem hesitação, na
Disciplina de Farmacologia da FOSJC-UNESP.*

*Pela paciência e atenção inigualáveis com que me transmite seus
conhecimentos.*

*Pela presença amiga e otimista me encorajando sempre, nos momentos
difíceis, a manter a autoconfiança e amor próprio.*

*Pela firmeza e determinação com que me encoraja a prosseguir,
enxergando as dificuldades como oportunidades de crescimento íntimo.*

*Pela demonstração de fé e dignidade diante dos sofrimentos e
incertezas que, por vezes, a vida nos reserva.*

Minha profunda gratidão. Que Deus ilumine seus caminhos!!

*“Mas todo homem seja pronto para ouvir,
tardio para falar, tardio para se irar.”*

Tiago, 1:19

À amiga,

*Professora Doutora Mônica Fernandes Gomes, da disciplina de
Patologia da Faculdade de Odontologia de S.José dos Campos - UNESP.*

Pelo exemplo de fé inabalável em Deus e nos ideais a Ele dedicados.

*Pela força com que sempre me exortou a buscar a fé em Deus pelo
trabalho, pela luta íntima, pela honestidade, firmeza de caráter e respeito
ao próximo.*

*Pela convivência alegre e otimista desde o início de minha carreira,
fazendo-me reconhecer o valor da colaboração mútua.*

*Por me mostrar o caminho da reflexão, da temperança, do perdão e da
humildade diante dos desígnios do Pai.*

*Por ter sido o instrumento de que Deus se utilizou para salvar esta
pesquisa, quando o infortúnio e a desesperança assolaram.*

*Por optar sempre pela integridade moral, clamando sem cessar pela
justiça em todos os momentos.*

Meu profundo e sincero agradecimento.

Que Deus a Abençoe!!

Aos meus amados pais Wanda Simões Martins Pinheiro e João Carlos Abrantes Pinheiro, responsáveis pela minha formação moral e profissional, pela confiança em mim depositada e pelo exemplo de fé, trabalho e determinação.

Com todo meu amor, minha eterna gratidão!

À Professora Titular Maria Amélia Máximo de Araújo, ex-Diretora da Faculdade de Odontologia de S. José dos Campos - UNESP, pela sua grandeza de caráter e inestimável estímulo e apoio à minha carreira acadêmica. Com todo meu respeito e reconhecimento !!

À Professora Doutora Celeste Simões, da Disciplina de Histologia e Embriologia, aposentada da Faculdade de Odontologia de S. José dos Campos - UNESP, pela grandeza espiritual, altruísmo, exemplo de abnegação e amor ao próximo, me sustentando nos momentos difíceis com sua orientação firme e amorosa. Minha profunda gratidão e amizade !!

À Professora Adjunta Ana Sueli Rodrigues Cavalcante, das disciplinas de Semiologia e Terapêutica da Faculdade de Odontologia de S. José dos Campos - UNESP, pelo apoio constante e presença leal em todos nos momentos difíceis

À Professora Adjunta Márcia Carneiro Valera Garakjs, responsável pela disciplina de Endodontia e coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de S. José dos Campos - UNESP, pelas palavras de estímulo, fé e apoio em minha jornada acadêmica. Com carinho!

À Professora Doutora Emília Ângela L. Arisawa, coordenadora do Curso de Odontologia da Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP, pela atenção e gentileza com que disponibilizou recursos técnicos para análises laboratoriais pertinentes a este trabalho.

À Professora Doutora Cristiane Yume Koga Ito, da disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de S. José dos Campos - UNESP, pelo apoio, amizade e atenção a mim dispensados que colaboraram para a conclusão deste trabalho.

Ao Professor Titular Sérgio Roberto Peres Line, da disciplina de Histologia e Embriologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pelo elevado espírito de dedicação a pesquisa, por todos os ensinamentos éticos e morais, pela amizade e, sobretudo, pela confiança em mim depositada.

Ao Professor Adjunto Pedro Duarte Novaes, da disciplina de Histologia e Embriologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pela atenção e colaboração dispensadas à realização deste trabalho.

Ao Professor Titular José Merzel, da disciplina de Histologia e Embriologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, por disponibilizar os meios necessários à realização da análise histomorfométrica deste experimento.

Ao Professor Titular Jaime Aparecido Cury, da disciplina de Bioquímica do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, por cooperar na formulação do protocolo para a realização dos procedimentos laboratoriais e das análises bioquímicas deste experimento.

Aos meus colegas da Pós-Graduação, em especial à Luciana Barros Sant'Anna, Silvana Pasetto e Regina Peres Line, pela convivência amigável, pelos momentos partilhados e experiências vividas ao longo desta jornada.

À amiga e técnica de laboratório Ivani Odas Demétrio, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, responsável pela realização das fases laboratoriais desta pesquisa. Agradeço sua dedicação, amizade e competência. Que Deus a abençoe !!

Ao técnico de laboratório, Sr. Walter Cruz da disciplina de Histologia e Embriologia da Faculdade de Odontologia de S. José dos Campos - UNESP, pela integridade, dedicação e colaboração nas fases laboratoriais deste trabalho.

Às técnicas de laboratório do Depto. de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, Maria Aparecida S. Varela e Eliene Aparecida Orsini N. Romani, pela atenção e pela amizade a mim dispensada!

Aos técnicos Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos e Lourival Jacob, do Biotério da Faculdade de Odontologia de S. José dos Campos - UNESP, pela preciosa colaboração no trato com os animais utilizados nesta pesquisa.

À EMBRARAD – Empresa Brasileira de Radiações, pela realização gratuita dos procedimentos de esterilização, os quais viabilizaram esta pesquisa.

Ao médico e amigo Dr. Luís César Fernandes, por me devolver a saúde, a qualidade de vida que permitiram chegar ao término deste trabalho. Minha estima e gratidão !!

Ao amigo Marco Mammoli, pelo apoio sincero, pela amizade e pelo encorajamento ao meu engrandecimento pessoal e profissional. Minha estima e admiração!

Aos meus alunos do Curso de Graduação da FOSJC - UNESP, em especial às minhas orientadas Ana Carolina de Oliveira, Aline M. T. da Silva e Regiane M. Carvalheiro, por representarem um estímulo constante ao meu aperfeiçoamento profissional e um desafio para o aprimoramento de minhas aptidões como educadora.

Aos animais experimentais, cujas vidas foram sacrificadas em benefício do progresso da ciência, agradeço o sacrifício maior, com a certeza de não ter sido em vão. Que Deus os guarde!

Que Deus não permita que eu perca o **ROMANTISMO**,
mesmo eu sabendo que as rosas não falam.

Que eu não perca o **OTIMISMO**,
mesmo sabendo que o futuro que nos espera não é assim tão alegre

Que eu não perca a **VONTADE DE VIVER**,
mesmo sabendo que a vida é, em muitos momentos, dolorosa...

Que eu não perca a vontade de **TER GRANDES AMIGOS**,
mesmo sabendo que, com as voltas do mundo, eles acabam indo embora de nossas vidas...

Que eu não perca a vontade de **AJUDAR AS PESSOAS**,
mesmo sabendo que muitas delas são incapazes de ver, reconhecer e retribuir esta ajuda.

Que eu não perca o **EQUILÍBRIO**,
mesmo sabendo que inúmeras forças querem que eu caia

Que eu não perca a **VONTADE DE AMAR**,
mesmo sabendo que a pessoa que eu mais amo, pode não sentir o mesmo sentimento por mim...

Que eu não perca a **LUZ** e o **BRILHO NO OLHAR**,
mesmo sabendo que muitas coisas que verei no mundo, escurecerão meus olhos...

Que eu não perca a **GARRA**,
mesmo sabendo que a derrota e a perda são dois adversários extremamente perigosos.

Que eu não perca a **RAZÃO**,
mesmo sabendo que as tentações da vida são inúmeras e deliciosas.

Que eu não perca o **SENTIMENTO DE JUSTIÇA**,
mesmo sabendo que o prejudicado possa ser eu.

Que eu não perca o meu **FORTE ABRAÇO**,
mesmo sabendo que um dia meus braços estarão fracos...

Que eu não perca a **BELEZA** e a **ALEGRIA DE VER**,
mesmo sabendo que muitas lágrimas brotarão dos meus olhos e escorrerão por minha alma...

Que eu não perca o **AMOR POR MINHA FAMÍLIA**,
mesmo sabendo que ela muitas vezes me exigirá esforços incriveis para manter a sua harmonia.

Que eu não perca a vontade de **DOAR ESTE ENORME AMOR** que existe em meu coração,
mesmo sabendo que muitas vezes ele será submetido e até rejeitado.

Que eu não perca a vontade de **SER GRANDE**,
mesmo sabendo que o mundo é pequeno...

E acima de tudo...

Que eu jamais me esqueça que **Deus** me ama infinitamente, que um pequeno grão de alegria e
esperança dentro de cada um é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois...

A VIDA É CONSTRUÍDA NOS SONHOS E CONCRETIZADA NO AMOR!

Francisco Cândido Xavier

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS	1
RESUMO	3
ABSTRACT	5
1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Estrutura, formação e remodelação óssea	13
2.2 Reparação óssea	15
2.3 Materiais biológicos de enxertos ósseos	23
3 PROPOSIÇÃO	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Animais	37
4.2 Preparação da matriz dentinária desmineralizada liofilizada	38
4.3 Preparo do animal, confecção do defeito ósseo cirúrgico e enxerto da MDDH-L	46
4.4 Período experimental	49
4.5 Análise macroscópica	49
4.6 Análise histomorfológica	49
4.7 Análise histomorfométrica	50
5 RESULTADOS	53
5.1 Análise Macroscópica	53
5.2 Análise Histomorfológica	59
5.3 Análise Histomorfométrica	76
6 DISCUSSÃO	81
7 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	93
ANEXO 1- Resultados Experimentais	109
ANEXO 2- Certificado do Comitê de Ética	111

LISTA DE SIGLAS

aFGF	Fator de crescimento fibroblástico ácido.
ANOVA	Análise de Variância.
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico.
BMP	Proteína morfogenética óssea.
CDPM	Proteína morfogenética derivada de cartilagem
FGF	Fator de crescimento do fibroblasto
GDF	Fator de crescimento e diferenciação
IGF	Fator de crescimento insulínico
kDa	kiloDalton
kGy	kiloGray
MDDA	Matriz dentinária desmineralizada autógena
MDDH	Matriz dentinária desmineralizada homóloga
MDDH-L	Matriz dentinária desmineralizada homóloga liofilizada
m-PTFE	Membrana de politetrafluoretileno
NCP	Proteína não colágena.
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta.
PRP	Plasma rico em plaquetas
ROG	Regeneração óssea guiada.
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta.
Vvi	Densidade de volume

RESUMO

A odontologia está inserida em um contexto de progresso tecnológico. Biomateriais têm sido utilizados com o intuito de acelerar o processo de regeneração óssea. Enxertos ósseos homogêneos liofilizados surgem como alternativa nas cirurgias reconstrutivas, por apresentarem propriedade osteopromotora. A liofilização permite, também, reduzir a carga antigênica dos biomateriais. A capacidade osteopromotora da matriz dentinária desmineralizada homogênea (MDDH) na regeneração óssea tem sido demonstrada. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos da MDDH liofilizada (MDDH-L) cuja preparação foi descrita em material e métodos, na regeneração de defeitos cirúrgicos. Neste trabalho, foram utilizados dezoito coelhos adultos jovens divididos em dois grupos (controle e tratado) de nove animais cada. Em ambos os grupos foram realizados defeitos cirúrgicos de 5mm de diâmetro na hemi-mandíbula direita. Na periferia do defeito ósseo do grupo tratado, foram colocadas partículas de MDDH-L e em seguida recoberto com a m-PTFE. O grupo controle foi recoberto somente com a m-PTFE. Os animais foram sacrificados 30, 60 e 90 dias após a cirurgia. As hemi-mandíbulas foram removidas e, após examinadas macroscopicamente, foram desmineralizadas em EDTA e incluídas em parafina para obtenção de cortes histológicos de 5 μ m de espessura e corados em HE. Foram descritas a citologia do osso e dos tecidos relacionados. A média de densidade de volume de matriz óssea neoformada foi significativamente maior no grupo tratado principalmente nos trinta primeiros dias. Concluiu-se que a MDDH-L é biocompatível, atuando como material osteopromotor na regeneração óssea, promovendo a neoformação de tecido ósseo de maneira mais rápida e em maior volume. Além disso, a liofilização da MDDH-L proporcionou facilidade de manuseio e armazenamento por longos períodos, mantendo as características de seus componentes bioativos.

ABSTRACT

Dentistry is inserted in the context of technological progress. Biomaterials have been used with the intention to accelerate the process of bone repair. Lyophilized homogeneous bone grafts appear as an alternative in rebuilding surgeries, due to their osteoinduction propriety. The lyophilization allows a reduction in the antigenic load of biomaterials. The osteopromoter capacity of homogeneous demineralized dentin matrix (HDDM) in bone repair has been demonstrated. The aim of this study was to analyze the effects of lyophilized HDDM (HDDM-L) which preparation was described in Material and Methods, in repairing surgery defects. Eighteen young adult rabbits were divided into two groups (control and treated) of 9 animals each. In both groups, surgical defects (holes) of 5mm diameter were done, on the right hemi-mandible. In the treated group, particles of HDDM-L were placed in the periphery of the defect and thereafter completely covered by ePTFE-m. In the control group, the HDDM-L was omitted, but the defect was covered by ePTFE-m. The animals were killed 30, 60 and 90 days after surgery. The hemi-mandibles were removed and after macroscopic examination were demineralized in EDTA and embedded in paraffin. Thick sections of 5 μ m were stained in HE. The cytology of the bone and of the related tissue was described. The mean volume density of neoformed bone matrix was significantly greater in the treated group, mainly in the 30 initial days. It was concluded that, HDDM-L is biocompatible, acting as osteopromoter material in bone repair and provides a neoformation of bone tissue in a more rapid manner and in greater volume. In addition to, the HDDM-L lyophilization afforded facility of handling and storing for long periods, maintaining the characteristics of its bioactive components.

1 INTRODUÇÃO

A odontologia atual está inserida em um avançado contexto de progresso tecnológico em que surgiram as mais diferentes aplicações na área de biomateriais utilizados com o intuito de acelerar o processo de regeneração óssea. As pesquisas realizadas com materiais de enxertos ósseos vão desde o uso em alvéolos dentários pós-exodontia, até à complementação de cirurgias de implantes osseointegrados ou defeitos ósseos periodontais e deformidades craniofaciais.

O osso é capaz de reparar-se por de remodelação fisiológica ou processo de regeneração após o trauma, o que inclui a exodontia e inserção de implantes. Enxertos e implantes podem ser colocados, segundo Misch & Dietsh⁶⁶ (1993), visando um aumento de massa óssea, podendo incorporar-se a este processo dando suporte ou estimulando o crescimento ósseo em áreas onde este tecido poderia ser reabsorvido como resultado de processos fisiológico, patológico ou traumático. Estes substitutos podem agir no osso hospedeiro por meio de dois diferentes mecanismos que são a osteocondução e a osteoindução.

Existem, portanto, duas classes de biomateriais: os osteoindutores e os osteocondutores.

Os materiais osteocondutores preenchem a cavidade orientando o tecido ósseo em sua neoformação. A osteocondução caracteriza a regeneração óssea por aposição sobre o tecido ósseo pré-existente e também sobre o material enxertado. Portanto, este processo deve ocorrer na presença de osso ou células mesenquimais diferenciadas. Os materiais osteocondutores são biocompatíveis, não apresentando reação tóxica evidente e os mais comuns são os aloplásticos, produtos exclusivamente sintéticos e não reabsorvíveis, desenvolvidos para responder a ampla gama de indicações. Estes materiais de enxerto apresentam-se com grande variedade de texturas, tamanho de partículas e formas, prontamente disponíveis. Podem ser separados em cerâmicos, polímeros e compósitos, existindo também a categoria de materiais osteocondutores

reabsorvíveis para manutenção e aumento do tecido ósseo, como o osso congelado ou irradiado.

Os materiais osteoindutores participam da reparação de uma ferida induzindo à formação de novo tecido ósseo. Entre os biomateriais osteoindutores mais estudados pode-se relacionar o osso autógeno, a matriz orgânica de osso humano, a matriz orgânica de osso bovino, o osso liofilizado e matriz dentinária desmineralizada autógena.

Os autoenxertos ósseos constituem hoje, umas das alternativas mais comumente utilizadas nas reconstruções ósseas craniofaciais. O fato, porém, de existirem áreas doadoras limitadas para sua retirada e de ocasionarem defeito na área doadora, justifica a preocupação dos especialistas em procurar novos materiais que possam substituí-los com resultados satisfatórios. Os materiais aloplásticos, que agem como corpos estranhos ao organismo, comprovadamente não induzem a osteogênese.

Desta maneira, os enxertos ósseos homogêneos, os quais pertencem a um indivíduo da mesma espécie que o receptor, porém de genótipo diverso, surgem como alternativa nas cirurgias reconstrutivas, por poderem ser armazenados e utilizados sem aumentar a morbidade, eliminando a necessidade de um local doador pelo próprio paciente. Além disso, sua disponibilidade permite seu emprego em grande quantidade e possuem, ainda, capacidade osteoindutora. A osteoindução caracteriza um material que é capaz de induzir a transformação de células indiferenciadas em osteoblastos ou condroblastos, mesmo em áreas onde não se espera tal comportamento. Os materiais osteoindutores contribuem mais eficientemente para a formação de osso durante o processo de remodelação.

A utilização do transplante de osso homogêneo como método de tratamento de patologias do esqueleto começou nos primórdios do século passado. O fator limitante do transplante ósseo era o armazenamento dos enxertos. Desde 1912, quando se iniciou o armazenamento destes enxertos em locais refrigerados, eles têm sido fervidos, congelados ou agitados em solução anti-séptica para sua conservação.

Existem três tipos de enxertos ósseos homogêneos: congelado, liofilizado e liofilizado desmineralizado. O osso congelado é obtido de cadáveres, e imediatamente congelado e estocado. Também poderá ser irradiado para diminuir a reação imune do receptor. É primariamente osteocondutor e raramente usado em implantodontia. No osso liofilizado, geralmente a matriz inorgânica é mantida, porém são requeridos osteoclastos para liberar os fatores de crescimento ósseo por causa dos sais de cálcio e fosfato que restaram. Os osteoclastos podem induzir a reabsorção óssea na região e tornar a reação do organismo ao enxerto imprevisível. O osso liofilizado também funciona primariamente por processo osteocondutor. O osso desmineralizado e liofilizado também é obtido de cadáveres e seu processamento é específico e amplas variações para sua obtenção poderão alterar os resultados do enxerto ósseo (Simões⁹², 1997). Com a consolidação destas várias técnicas utilizadas na preparação de enxertos ósseos para o armazenamento, a existência de diferenças significativas entre as mesmas passou a ser discutida.

Em razão da rejeição imunológica de transplantes entre indivíduos ou entre espécies, a utilização dos mesmos está condicionada à redução da carga antigênica e à diminuição do risco de transmissão de infecções. Alguns métodos têm sido utilizados para melhorar o índice de sucesso dos procedimentos de enxerto nesses casos. Duas abordagens básicas são clinicamente utilizadas: a supressão da resposta imunológica do hospedeiro e a alteração da antigenicidade do enxerto de forma a não estimular a resposta imune do paciente. Vários métodos de tratamentos de enxertos têm sido usados, incluindo a fervura, a desproteínização, o congelamento, a irradiação, o calor a seco e a liofilização (Simões⁹², 1997).

A técnica de liofilização, em tecido ósseo, consiste na retirada de umidade do osso previamente desengordurado, o que permite a possibilidade de estocagem por longos períodos. Inúmeras vantagens e desvantagens do osso liofilizado em relação ao congelado foram estabelecidas. As vantagens do primeiro são a diminuição acentuada da antigenicidade, menor risco de transmissão de doenças (Zasacki¹¹⁰, 1991), maior disponibilidade por possibilidade de uso de doadores mortos ou membros amputados, praticidade no armazenamento e manuseio trans-operatório do enxerto, uma vez que os ossos são armazenados em temperatura ambiente por até quatro a cinco anos, havendo mínima alteração bioquímica. Como desvantagens são apontadas a alteração de propriedades mecânicas como a perda de resiliência, aumentando sua fragilidade (Mellonig *et al.*⁶⁵, 1992).

Na década de sessenta ficou comprovada, por intermédio de estudos de Urist^{101, 102} (1965, 2002) e seus colaboradores, a relação entre antigenicidade e capacidade osteogênica do enxerto, estabelecendo-se que a menor capacidade osteogênica do enxerto homogêneo deveria ser oriunda de sua antigenicidade, a qual mostrou relação direta com a prévia sensibilização do receptor.

Desde então, a liofilização de enxertos ósseos homogêneos é o processo mais utilizado para a redução da carga antigênica, pois além de eliminar os elementos celulares do enxerto, ainda possibilita a conservação dos enxertos em temperatura ambiente, facilitando sua utilização.

Paralelamente às pesquisas que utilizam ossos liofilizados como material de enxerto, cabe-nos destacar inúmeros trabalhos que relacionam a atividade osteoindutora da matriz dentinária desmineralizada autógena (Urist & Strates¹⁰³, 1971; Catanzaro-Guimarães *et al.*²¹, 1986; Veis *et al.*¹⁰⁴, 1989; Gonçalves *et al.*³⁶, 2002; Gomes *et al.*^{35, 34}, 2001, 2002) e, mais recentemente, aqueles que ressaltam as propriedades osteopromotoras da matriz dentinária desmineralizada homogênea (Yoshida *et al.*¹⁰⁹, 1998; Okamoto *et al.*⁷⁷, 1999; Carvalho¹⁹, 2001; Cheng *et al.*²³, 2001).

Baseados em trabalhos acima referidos e na necessidade do desenvolvimento de técnicas de manuseio de biomateriais de enxerto ósseo e, sobretudo, de métodos efetivos de conservação dos mesmos, acreditamos que a avaliação da matriz dentinária desmineralizada homogênea liofilizada (MDDH-L) aplicada ao processo de reparação óssea seja de relevância, sobretudo na área odontológica, onde são inúmeras as condições patológicas que levam a significativas perdas ósseas na cavidade bucal.

2 REVISÃO

2.1 ESTRUTURA, FORMAÇÃO E REMODELAÇÃO ÓSSEA

O osso é um tecido conjuntivo especializado composto por partes mineral e orgânica, organizado para desempenhar, dentre outros, o papel de estrutura de sustentação do corpo. O esqueleto constitui o suporte mecânico do organismo que, além de servir de apoio para as contrações dos músculos esqueléticos transformando-as em movimentos, proporciona proteção para as partes e órgãos moles. Os ossos são também reservatórios de cálcio, fosfato e outros íons, sendo essenciais na manutenção dos níveis plasmáticos desses elementos. Apesar do aspecto aparentemente inerte, os ossos crescem e são ativamente remodelados durante toda a vida do organismo, sendo a homeostase do tecido ósseo controlada por fatores mecânicos e humorais, locais e gerais (Katchburian & Arana-Chavez⁵³, 1999).

Encontramos no tecido ósseo células que constituem os principais agentes da modificação da matriz óssea, como o osteoblasto que produz a matriz que se mineraliza de maneira bem regulada e o osteoclasto que quando ativado, remove esta matriz (Martin⁶³, 1994).

A formação do tecido ósseo tem sido considerada como a mais alta etapa na evolução dos tecidos de suporte. Ela resulta de uma complexa cascata de ocorrências que envolvem a proliferação de células mesenquimais primitivas, diferenciação em células precursoras osteoblásticas (osteoprogenitora, pré-osteoblasto), maturação dos osteoblastos, formação de matriz e, finalmente, mineralização (Ericksen *et al.*³⁰, 1986).

No processo de formação óssea, ocorre inicialmente a atração quimiotática dos precursores dos osteoblastos, provavelmente, mediada por fatores locais. Em seguida, temos a proliferação de células precursoras dos osteoblastos. A quimiotaxia e a indução mitótica dessas células é mediada por fatores de crescimento liberados a partir do tecido ósseo degradado durante o processo de reabsorção. Um dos mediadores responsáveis por este efeito é o

fator transformador beta (TGF- β), uma vez que TGF- β ativo é liberado por culturas ósseas em reabsorção (Pfeilschifter *et al.*^{79, 80}, 1990, 1990a; Martin⁶³, 1994).

Os fatores de crescimento são polipeptídeos sintetizados por uma variedade de células que, em determinadas situações, podem agir como agentes sistêmicos, mas geralmente agem como substâncias reguladoras locais, aumentando a replicação celular e também induzindo à diferenciação celular. Entre eles estão os membros da superfamília do TGF- β e vários outros que são seqüestrados da matriz óssea e estimulam a proliferação do osteoblasto, incluindo os fatores de crescimento insulínico I e II (IGF-I e II), fator de crescimento do fibroblasto (FGF) e fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF). Estes fatores de crescimento podem, inclusive, evitar a apoptose osteoblástica *in vitro* (Hill *et al.*⁴⁵, 1997).

Numa fase mais avançada tem-se a diferenciação dos osteoblastos em células maduras que promovem a síntese de matriz óssea com posterior mineralização. Vários fatores de crescimento podem causar o surgimento de marcadores dos fenótipos dos osteoblastos diferenciados incluindo a expressão da atividade da fosfatase alcalina, colágeno do tipo I e osteocalcina, sendo os mais importantes o IGF-I e a BMP-2 (Massague⁶⁴, 1985; Roberts *et al.*⁸⁶, 1985).

O tecido ósseo difere dos demais tecidos não só na sua estrutura físicoquímica como também na sua extraordinária capacidade de remodelação e de regeneração durante todo o período pós-fetal. O osso, em diversos momentos, precisa modificar sua forma ou sua estrutura seja para um osso primário se tornar maduro, para crescer mantendo sua forma, para um osso esponjoso se tornar compacto, ou para se adaptar a novas situações fisiológicas ou patológicas. Em todos esses casos, fenômenos simultâneos ou seqüenciais de formação e de reabsorção óssea constituem o processo de remodelação.

A habilidade inata do tecido ósseo de remodelação e regeneração ao longo da vida tem sido atribuída tanto à proliferação de células osteoprogenitoras pré-formadas quanto à indução da proliferação e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas, resultante de complicadas interações entre

mediadores químicos liberados localmente de forma ativa, como consequência do processo de reabsorção (Cormack²⁶, 1991; Manolagas & Jilka⁶², 1995)

Saber que mecanismos controlam a remodelação óssea ainda é uma questão intrigante. Uma questão-chave é como os osteoclastos são direcionados a um lugar específico para realizar a reabsorção óssea. Osteoblastos estimulados por hormônios ou, talvez, por alterações locais, como a movimentação dentária, podem proporcionar um mecanismo de controle para reabsorção óssea. Sabe-se que os osteoclastos só podem reabsorver superfícies mineralizadas. Deve ocorrer, também, sinalização hormonal, uma vez que a calcitonina e a leupeptina inibem a liberação de cálcio e a atividade colagenolítica, presumivelmente por terem como alvo os osteoclastos. Por outro lado, o processo de reabsorção pode ser auto-regulável devido à dissolução mineral que precede a degradação da matriz orgânica no interior da lacuna de Howship, estabelecido pelo osteoclasto. A repetida atividade de deposição e remoção de tecido ósseo acomodam o crescimento de um osso, sem que ele perca a função ou o relacionamento com as estruturas adjacentes durante o processo de remodelação (Ten Cate⁹⁸, 2001).

2.2 REPARAÇÃO ÓSSEA

O osso é um dos tecidos do organismo com capacidade de regeneração, restaurando, completamente, a sua estrutura e função original quando lesado (Schenk⁸⁹, 1994; Szachowicz⁹⁶, 1995; Hollinger & Wong⁴⁶, 1996). O processo de reparação óssea é similar ao desenvolvimento ósseo embriogênico normal, incluindo migração de células mesenquimais, proliferação e diferenciação em células osteogênicas. Essa resposta ocorre como uma seqüência contínua de eventos celulares que se inicia pela injúria tecidual, terminando com completa remodelação sem deixar cicatriz, sendo esse processo semelhante à ossificação intramembranosa ou endocondral (Bostrom¹⁰, 1998; Junqueira *et al.*⁵², 2002).

A regeneração e remodelação óssea são reguladas por hormônios sistêmicos e por fatores locais que afetam as células da linhagem dos osteoclastos e osteoblastos e exercem seus efeitos sobre a replicação de células não diferenciadas, no recrutamento das mesmas e na função diferenciada destas (Canalis¹⁶, 1983; Martin⁶³, 1994).

Sendo assim, busca-se um melhor conhecimento de todos esses fatores que permitam manipulação da reparação óssea. Atualmente, a regeneração óssea guiada (ROG) é um dos campos de maior crescimento na Odontologia e Medicina. Muitas pesquisas têm sido realizadas para acelerar a resposta de regeneração óssea em cirurgias utilizando-se materiais osteoindutores de ação local como, por exemplo, a matriz óssea desmineralizada autógena (Urist^{101,102}, 1965, 2002; Alper *et al.*⁴, 1989; Bessho *et al.*⁸, 1992), a matriz dentinária autógena desmineralizada (Catanzaro-Guimarães *et al.*²¹, 1986; Bessho *et al.*⁹, 1990; Catanzaro-Guimarães²⁰, 1993; Gonçalves *et al.*³⁶, 2002; Gomes *et al.*^{35,34}, 2001, 2002) e ainda alguns fatores de crescimento ósseo (Becker *et al.*⁷, 1992), sendo a ação destes baseada no aumento da proliferação osteoblástica e da síntese de matriz óssea. Segundo Catanzaro-Guimarães²⁰ (1993) todo o processo de osteoindução e/ou osteopromoção é controlado por complexas interações moleculares e mensagens celulares de curta e longa extensão que influenciam quimiotaxia, proliferação, diferenciação e subseqüentemente, a velocidade e duração do trabalho das células de linhagem osteoblástica e osteoclástica.

Alguns autores afirmam que a proliferação celular, no processo de regeneração óssea, é iniciada por fatores estimuladores locais como a proteína morfogenética óssea (BMP) (Urist & Strates¹⁰³, 1971; Gomes *et al.*^{35,34}, 2001, 2002). As proteínas estruturais, tal como os colágenos, também poderiam estar envolvidos, uma vez que o colágeno do tipo I e seus fragmentos causam o mesmo efeito (Mundy⁶⁷, 1994).

Esses fatores locais são sintetizados por células do tecido ósseo e incluem fatores de crescimento, citocinas, prostaglandinas. Os fatores de

crescimento regulam a replicação e função diferenciada das células, exercendo seus efeitos sobre as células da mesma classe (fatores autócrinos) ou sobre as células de outras classes dentro do tecido (fatores parácrinos), porém, também podem, por intermédio da circulação, agir como reguladores sistêmicos do metabolismo esquelético. Os fatores produzidos localmente possuem funções mais diretas e importantes no crescimento celular, podendo desempenhar papel fundamental na aposição da matriz óssea e reabsorção da mesma e, possivelmente, na patofisiologia das disfunções ósseas (Hill *et al.*⁴⁴, 1998).

Dessa maneira, a matriz óssea é uma rica fonte de fatores de crescimento, como o fator de crescimento insulínico I e II (IGF I e II), o transformador β (TGF- β -I e TGF- β -II), o derivado de plaquetas (PDGF), o fibroblástico ácido e básico (aFGF e bFGF) e a proteína morfogenética óssea (BMP) que, segundo Busch *et al.*¹³ (1996), teriam sua produção regulada por hormônios sistêmicos e estresse mecânico local.

Dentre os fatores de crescimento acima citados, a proteína morfogenética óssea foi originalmente identificada como proteína da matriz óssea com capacidade de induzir formação óssea heterotópica quando enxertada em músculo de ratos (Urist^{101, 102}, 1965, 2002). Foi a partir desse estudo que surgiu a idéia de que fatores indutores de formação óssea residem dentro do tecido ósseo (Brownell¹¹, 1990).

Por meio de técnicas moleculares, identificou-se uma família de proteínas morfogenéticas ósseas estruturalmente relacionadas, contendo seqüências de aminoácidos homólogas às proteínas do TGF- β . A análise de identificação das BMPs permitiu sua divisão em várias subfamílias.

O exame da seqüência de aminoácidos das proteínas morfogenéticas demonstrou que as proteínas BMP-2 e BMP-4 são constituintes do subgrupo mais relacionado na literatura. Estas proteínas apresentam 86% da seqüência de aminoácidos idênticas entre si e 33-35% idênticas à seqüência do TGF- β . O segundo subgrupo, formado por BMP-5, BMP-6 (Vgr), BMP-7 (OP-1) e BMP-8 (OP-2), exibe cerca de 73-83% de aminoácidos similares entre si e são

provavelmente homólogos do gene Vgr/60. A BMP-6 humana apresenta 91% da seqüência de aminoácidos do Vgr-1, um peptídeo derivado da hibridação cruzada de aminoácidos do embrião de camundongo com Vgr-1, uma proteína envolvida com o desenvolvimento embrionário. Por esta razão, considera-se o Vgr-1 como homólogo, nos roedores, da BMP-6 humana. A BMP-7 diferencia-se das demais BMPs por não apresentar atividade morfogênética e não pertencer à família do TGF- β , sendo hoje considerada como uma procolágeno C-proteinase. O terceiro subgrupo é formado apenas pela BMP-3, ou osteogenina, com 45% de seqüências idênticas ao BMP-2.

Descreve-se, ainda, uma subfamília de proteínas similares a BMP, importantes na formação óssea, clonadas mais recentemente, as quais foram denominadas de fator de crescimento e diferenciação 5 (GDF-5) ou proteínas morfogênicas derivadas de cartilagem 1 (CDPM-1), GDF-6 ou CDMP-2 e GDF-7 ou BMP-12. Estas são homólogas em 80-86% entre si, e 46-57% idênticas às BMP-2 e até à BMP-8 (Ripamonti & Reddi⁸⁵, 1994; Rosen & Thies⁸⁷, 1995; Helder *et al.*⁴³, 1998; Gonçalves *et al.*³⁶, 2002).

As BMPs são um produto do metabolismo dos osteoblastos, odontoblastos e de várias células tumorais, sendo armazenada na forma de concentrados no osso, dentina e em células neoplásicas do osteossarcoma e de certos tumores odontogênicos, tais como: fibroma cementificante, cementoblastoma benigno, dentinoma, fibroma odontogênico e odontoma (Urist & Strates¹⁰³, 1971; Raval *et al.*⁸³, 1996; Gao *et al.*³², 1997).

As BMPs têm função de regular a diferenciação do tecido cartilaginoso e ósseo *in vivo*, apresentando vários papéis durante o desenvolvimento embrionário e durante a organogênese, incluindo a esqueletogênese e o desenvolvimento crânio-facial dos tecidos ósseos e dentários. Durante a reabsorção óssea, os osteoclastos degradam a matriz óssea, propiciando a liberação da BMP que induz quimiotaxia, proliferação e diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoblastos, bem como aumentam a síntese de matriz óssea (Urist & Strates¹⁰³, 1971; Bessho *et al.*^{9, 8}, 1990, 1992). Entretanto, pouco se

conhece sobre o papel das BMPs na regeneração óssea de fraturas ou das demais lesões no tecido ósseo (Bostrom¹⁰, 1998).

Jin & Yang⁵¹ (1990) foram os primeiros autores a descrever a presença de proteínas morfogenéticas ósseas durante a reparação de fraturas. Usando um anticorpo contra essa proteína, os autores revelaram a presença de BMP nas células mesenquimais ao redor do periósteo e dentro da medula óssea.

Ishidou *et al.*⁴⁹ (1995) também verificaram a presença de BMP na reparação de fraturas em ratos. Técnicas imunohistoquímicas mostraram que as expressões de BMP-2, BMP-4 e BMP-7 foram consideravelmente maiores nas células osteogênicas do periósteo próximo às extremidades da fratura durante estágios iniciais da reparação.

O reparo ósseo decorrente de lesões, fraturas, defeitos e/ou após inserção de enxertos é ativado pela liberação de fatores de crescimento, como as BMPs abundantes na matriz óssea e produzidas por osteoblastos. Helder *et al.*⁴³ (1998) estudaram a aplicação de fatores de crescimento em áreas onde os tecidos periodontais foram perdidos durante o processo inflamatório. Relata-se a aplicação de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento insulínico (IGF), fator de crescimento dos fibroblastos (FGF) e proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), pois estes são capazes de estimular a proliferação de células com fenótipo osteoblástico ou do ligamento periodontal, promovendo a formação óssea ou a regeneração periodontal em estudos em animais ou *in vitro*. Seu uso na terapia periodontal é bastante promissor necessitando pesquisas mais extensas para garantir a utilização em humanos.

A osteoindução no processo de reparação óssea tem sido descrita como um fenômeno de transformação de células mesenquimais em células osteoprogenitoras ou osteoprecursoras, classificadas como osteoprecursoras ou osteogênicas determinadas e osteoprecursoras induzíveis, segundo Friedstein³¹ (1976) e Nakashima^{73, 72} (1990, 1992), podendo estas últimas, serem encontradas em vários tecidos conjuntivos. As células osteoprecursoras determinadas encontram-se em tecidos diretamente relacionados ao tecido ósseo, tais como

medula óssea e camada profunda do periósteo e do endósteo. Quando substâncias osteoindutoras, como a proteína morfogenética óssea purificada e/ou matriz óssea desmineralizada (Catanzaro-Guimarães *et al.*²¹, 1986; Bessho *et al.*^{9,8}, 1990, 1992) atuam sobre estas células, a reação ocorre pela neoformação óssea direta, ou ossificação intramembranosa, também conhecida por reação óssea ortotópica. Neste caso, a osteogênese é mais rápida, sendo o osso neoformado depositado diretamente sobre as superfícies ósseas pré-existentes. Estas células reagem à indução diretamente com proliferação e diferenciação em osteoblastos. As células osteoprecursoras induzíveis podem ser encontradas em tecidos distantes do tecido ósseo, sendo abundantes no tecido conjuntivo subcutâneo, no tecido muscular esquelético, baço e fígado e, normalmente, não produzem ossos. Entretanto, em contato com um indutor adequado, como a proteína morfogenética óssea, estas células diferenciam-se em condroblastos e/ou osteoblastos resultando na produção ectópica de cartilagem e tecido ósseo imitando a ossificação endocondral (Reddi⁸⁴, 1981; Gonçalves *et al.*³⁶, 2002).

No contexto da regeneração óssea guiada, não está claro se as macromoléculas indutoras, que atuam nas células osteoprecursoras predeterminadas, são as mesmas que atuam nas osteoprecursoras induzíveis (Buser *et al.*¹⁴, 1994). Sabe-se, contudo, que os eventos em cascata, que culminam com a formação óssea heterotópica envolvem etapas da ossificação endocondral como a migração, a proliferação de células mesenquimais precursoras induzíveis, a condrogênese, a mineralização de cartilagem, a reabsorção, invasão da cartilagem por tecido conjuntivo vascular e neoformação óssea estimulada por membros da superfamília do fator de crescimento transformador beta (Hammerle *et al.*^{42, 41}, 1992, 1995; Buser *et al.*¹⁴, 1994; Gonçalves *et al.*³⁶, 2002; Gomes *et al.*³⁵, 2001).

Os eventos celulares acima descritos, fundamentais no processo de regeneração óssea podem, eventualmente, serem inibidos pela proliferação de tecido mole no defeito ósseo. A penetração e a rápida formação de tecido conjuntivo frouxo na área de reparação constituem obstáculo para o sucesso do

processo de neoformação óssea, pois podem perturbar ou impedir totalmente a osteogênese (Bruder *et al.*¹², 1994).

Os mecanismos que atuam no tecido conjuntivo frouxo interferindo na osteogênese ainda não estão totalmente conhecidos. Experimentos, *in vivo*, demonstram que os fibroblastos produzem um ou mais fatores solúveis inibidores da diferenciação de células ósseas e osteogênicas (Ogiso *et al.*⁷⁶, 1991). Outra possível explanação sugerida por Schmitz *et al.*⁹¹ (1990) é que a ocorrência da reparação conjuntiva, não óssea, pode ser devida a uma falha das células presentes para calcificar a matriz, talvez causada pela ausência de formação óssea adequada e pela diferenciação osteoblástica deficiente em grandes defeitos ósseos.

Visando impedir a proliferação tecidual indesejada na área a ser reparada, o princípio da osteopromoção indica o uso de meios físicos como membranas ou barreiras, para vedar um local anatômico de modo a prevenir que outros tecidos, principalmente, o tecido conjuntivo, interfiram com a osteogênese bem como com a formação óssea direta (Dahlin *et al.*²⁷, 1988).

Segundo Junqueira *et al.*⁵² (2002), o uso de barreiras mecânicas para isolar um sítio anatômico, no intuito de selecionar determinado tecido e excluir outros, direcionando a regeneração da área, foi relatado primeiramente por Murray *et al.*⁶⁸ (1957). Os autores removeram um fragmento do ilíaco de cães e recobriram o defeito com material plástico, rígido o suficiente para manter um espaço entre o tecido ósseo e a face interna do material quando os retalhos fossem suturados em posição. Após dez semanas verificaram crescimento de tecido ósseo com as características histológicas próprias deste tecido.

Posteriormente, outros autores empregaram o mesmo princípio para a reconstrução dos defeitos de ossos longos e mandibulares. Na década de 1980, essa técnica foi testada em vários estudos experimentais para a regeneração de tecidos periodontais, onde foi criado o conceito de regeneração tecidual guiada (Nyman *et al.*⁷⁵, 1982). A aplicação dessa técnica para a correção de defeitos ósseos periodontais foi o passo seguinte, criando-se o conceito de regeneração

óssea guiada (Dahlin *et al.*²⁷, 1988).

A barreira de politetrafluoretileno (m-PTFE), que consiste em um polímero quimicamente estável e biologicamente inerte, capaz de resistir ao ataque enzimático e microbiológico, tem sido muito utilizada.

Schmitz *et al.*⁹¹ (1990) em estudo experimental da utilização de barreiras mecânicas na técnica de regeneração óssea guiada (ROG) analisaram o reparo de alvéolos dentários, de humanos, com e sem o uso de m-PTFE em estudo imuno-histoquímico. Os alvéolos foram recobertos por m-PTFE no grupo teste e observados microscopicamente quatro semanas após a exodontia. Observou-se que nos dois grupos analisados havia a presença de infiltrado de células inflamatórias mononucleares, sendo este, entretanto, escasso no grupo que recebeu a proteção da m-PTFE. A marcação histoquímica das células e matriz extracelular na região de reparação evidenciou colágeno tipo I, osteonectina e sialoproteína óssea, revelando, portanto, que essas células, neste local, eram de linhagem osteoblástica.

Strates *et al.*⁹⁵ (1988) analisaram o uso de m-PTFE quanto às mudanças cronológicas no osso neoformado e alterações em sua natureza estrutural, assim como os efeitos dos períodos de aplicação da membrana no osso neoformado e seu processo de remodelação após a remoção da membrana experimental. Após duas semanas de aplicação da técnica de regeneração óssea guiada (ROG) as cavidades ósseas do grupo tratado haviam sido completamente preenchidas por tecido ósseo neoformado. Já no grupo controle a corticalização na superfície do osso neoformado mostrava um decréscimo. Os espaços ósseos medulares alargaram-se por volta da 12ª semana pós-cirurgia no grupo tratado, denotando-se maior atividade de remodelação óssea no referido grupo. Concluiu-se que a aplicação de membrana em defeitos ósseos durante o processo de reparação dos mesmos leva a um aumento do volume dos espaços ósseos medulares.

Atualmente, a regeneração óssea guiada apresenta uma vasta indicação e tem sido também testada no tratamento de fratura óssea contínua, em

defeitos de ossos longos, na correção de rebordos edêntulos ou defeitos residuais, em alvéolos após exodontia, em implantes imediatos e na recuperação de implantes por perimplantite (Junqueira *et al.*⁵², 2002).

A técnica de ROG aplicada a defeitos ósseos cirúrgicos constitui um bom modelo para se estudar a reparação óssea. Ao contrário das fraturas, os defeitos são menos sujeitos aos fatores mecânicos e obstruções de suprimento sangüíneo. Portanto, os defeitos ósseos têm sido amplamente usados em estudos com animais experimentais, buscando uma melhor regeneração óssea pelo uso de diferentes materiais de enxerto, técnicas cirúrgicas ou medicamentos (Schenk⁸⁹, 1994; Junqueira *et al.*⁵², 2002).

2.3 MATERIAIS BIOLÓGICOS DE ENXERTOS ÓSSEOS

Os enxertos estão sendo aplicados, cada vez mais, em defeitos nos ossos maxilo-faciais, especialmente na mandíbula, reconstruindo desde pequenas fendas alveolares até grandes defeitos resultantes de mandibulectomia. O enxerto de tecido mais comumente utilizado para reconstrução dessas estruturas anatômicas é o osso. Esses enxertos têm sido utilizados há várias décadas alcançando graus variados de sucesso. Os recentes avanços na compreensão da fisiologia óssea, nos conceitos imunológicos, nos procedimentos de armazenamento, na criação de bancos de tecidos e nos princípios cirúrgicos têm aumentado bastante a margem de sucesso e qualidade dos resultados dos enxertos (Simões⁹², 1997).

Misch & Dietsh⁶⁶ (1993) referenciaram três classes de materiais para enxertos ósseos, baseados na origem e no modo de ação, podendo ser autógenos, homógenos ou heterógenos.

Os enxertos ósseos mais usados são os autógenos, compostos de tecido do próprio indivíduo, devido à sua maior compatibilidade imunológica e por apresentar melhores resultados em relação à regeneração óssea. Além do tecido

ósseo, hidroxiapatita e partículas de dentina e de cimento têm sido usados para induzir a osteogênese em cirurgias ósseas, particularmente em cirurgias periodontais e tratamento de perimplantite (Catanzaro-Guimarães *et al.*²¹, 1986; Nociti *et al.*⁷⁴, 2001). Os enxertos ósseos mais comumente utilizados têm sido os de osso esponjoso, especialmente em áreas com grande perda tecidual, como nas correções de defeitos maxilo-faciais, em cirurgias ósseas oncológicas, em cirurgias corretivas do periodonto e no tratamento de perdas ósseas alveolares (Yeomans & Urist¹⁰⁸, 1967; Knudsen *et al.*⁵⁷, 1974; Veis *et al.*¹⁰⁴, 1989; Nade⁶⁹, 1994; Chiapasco *et al.*²⁴, 1999; Pallensen *et al.*⁷⁸, 2002).

Enxertos autógenos, intramembranosos e endocondrais podem ser usados frescos ou desmineralizados. Alguns estudos demonstraram que a matriz óssea endocondral desmineralizada induz à formação óssea via cartilagem, enquanto outros trabalhos mostraram que na ossificação intramembranosa o osso se forma sem que haja uma fase de cartilagem intermediária (Isaksson & Alberius⁴⁸, 1992; Rabie *et al.*⁸², 1996; Schliephake *et al.*⁹⁰, 2000).

Os ossos com diferentes origens embrionárias quanto ao modelo de ossificação, podem apresentar características distintas frente a enxertos. Uma comparação da resposta biológica, com enxerto de fosfato octacálcico em ossos de origem intramembranosa e endocondral foi realizada por Sasano *et al.*⁸⁸ (1995). Estes pesquisadores demonstraram haver indução de condrogênese e osteogênese com enxerto de fosfato octacálcico nos ossos longos (tíbia), mas somente osteogênese nos defeitos ósseos em ossos de origem intramembranosa (calvária).

Em 1999, Chiapasco *et al.*²⁴ analisaram clinicamente a reconstrução de rebordos estreitos e desdentados antes da instalação do implante. Para isso, enxertaram fragmentos ósseos retirados de outras áreas da cavidade bucal, que foram fixados com parafusos de aço inoxidável. Estes autores observaram um ganho ósseo significativo de até 4mm com a utilização desse tipo de enxerto.

Pallensen *et al.*⁷⁸ (2002) testaram o papel de diferentes tamanhos de partículas (entre 2 e 10mm³) de osso autógeno mineralizado e triturado em

estágios iniciais da reparação óssea. As partículas menores se mostraram preferenciais, pois aceleraram a reparação óssea nos períodos iniciais, além de induzir formação de maior quantidade de osso, o qual também apresentou um maior grau de maturação. Observou-se ainda, neste experimento, que a reação de reabsorção foi mais intensa com partículas de tamanho menor, apresentando, portanto, alto grau de substituição óssea após quatro semanas.

Lundgren *et al.*⁶⁰ (1997a) avaliaram o enxerto de partículas de osso liofilizado autógeno mineralizado, após doze semanas do implante de titânio de Branemark e notaram aumento de volume do osso neoformado pelo aumento do espaço medular, não havendo, entretanto, aumento de massa óssea mineralizada.

Ainda Lundgren *et al.*⁵⁹ (1997), enxertaram partículas de osso liofilizado autógeno em defeitos ósseos em calota craniana de coelhos com e sem cobertura de membrana reabsorvível. Os autores concluíram que a associação de membrana reabsorvível mais osso autógeno resultou num aumento significativo de formação óssea após doze semanas, tanto em volume, quanto em massa estrutural do tecido neoformado.

Trabalhos utilizando enxertos ósseos liofilizados heterógenos também são relacionados na literatura como em Zasacki¹¹⁰ (1991), Caplanis *et al.*¹⁷ (1998), Cho *et al.*²⁵ (1998), e Hammerle *et al.*⁴⁰ (1997) que testaram partículas de 300µm de osso bovino desproteinizado em calvária de coelhos e observaram sua propriedade osteocondutora, acelerando a neoformação óssea nas fases iniciais do processo de regeneração guiada, pelo aumento no recrutamento dos osteoblastos.

Em 1998, Hammerle *et al.*³⁹ testaram os efeitos do osso desproteinizado liofilizado bovino (BIO OSS) em deiscência de defeitos em torno de implantes, em macacos. Após seis meses da cirurgia, os autores puderam concluir que o BIO OSS exibiu propriedade osteocondutora, sendo recomendado para enxertos em defeitos de deiscência, pois promoveu o crescimento ósseo vertical e horizontal.

Carvalho *et al.*¹⁸ (1998) testaram a capacidade de neoformação óssea da matriz de osso esponjoso bovino liofilizado associado a implantes de titânio em ratos e concluíram que esse material de enxerto atuou como osteocondutor nos estágios iniciais da reparação, além de ser parcialmente reabsorvido durante o processo de regeneração óssea.

A neoformação óssea devido à implantação de matriz óssea desmineralizada ou de proteína morfogenética óssea purificada, em defeitos ósseos cirúrgicos também tem sido bastante estudada. A atuação das proteínas morfogenéticas ósseas e de fatores de crescimento ósseo seria primeiramente local, atuando de forma coordenada e seqüencial. A proteína morfogenética óssea atuaria na proliferação e na diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas enquanto o fator de crescimento ósseo estimularia a produção da matriz óssea neste sistema estimulado, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Urist & Strates¹⁰³, 1971; Bessho *et al.*⁸, 1992).

Bessho *et al.*^{9, 8} (1990, 1992) sugerem para a regeneração óssea guiada uma combinação de enxertos de osso mineralizado com matriz óssea desmineralizada. Os autores acreditam que a função do enxerto com fragmentos ósseos mineralizados seja induzir à neovascularização no interior do defeito, enquanto que as células mesenquimais indiferenciadas da região perivascular dos novos vasos sangüíneos, seriam induzidas a se diferenciarem em osteoblastos pelas proteínas morfogenéticas ósseas da matriz óssea desmineralizada.

Alper *et al.*⁴ (1989), Rabie *et al.*⁸² (1996) e Lundgren *et al.*⁵⁹ (1997) afirmaram que os enxertos em ossos podem agir como barreira física, prevenindo o crescimento do tecido conjuntivo para o interior do defeito e favorecendo, desta maneira, a regeneração óssea por células específicas osteogênicas.

Assim também, Caplanis *et al.*¹⁷ (1998) utilizaram enxertos homógenos de matriz óssea desmineralizada em defeitos periodontais induzidos em cães e concluíram que as partículas de matriz óssea auxiliaram no processo de reparação por meio de osteocondução e também por impedirem a proliferação conjuntiva na área estudada.

Paralelamente às pesquisas realizadas com a aplicação de matriz óssea e osso liofilizado como materiais de enxerto ósseo, desde 1960, com os estudos de Urist^{101, 102} (1965, 2002), enxertos de dentina desmineralizada vêm sendo pesquisados em animais experimentais. Recentemente a dentina desmineralizada vem sendo utilizada para reconstrução óssea em cirurgias bucais e defeitos ósseos (Urist & Strates¹⁰³, 1971; Veis *et al.*¹⁰⁴, 1989; Gonçalves *et al.*³⁶, 2002; Carvalho¹⁹, 2001; Gomes *et al.*^{35, 34}, 2001, 2002).

O potencial quimiotático e osteogênico da matriz óssea e dentinária está associado à proteína morfogenética óssea (Bessho *et al.*⁹, 1990). A matriz óssea, a rigor, é a maior fonte de fatores de crescimento dentre os tecidos mineralizados. Alguns fatores de crescimento são produzidos pelos osteoblastos, como o insulínico (IGF-I e II), o transformador β (TGF- β), o fibroblástico (FGF) e o derivado das plaquetas (PDGF). Além da proteína morfogenética óssea, a matriz dentinária também é rica nestes outros fatores de crescimento (Bessho *et al.*^{9, 8}, 1990, 1992; Buser *et al.*¹⁴, 1994; Tziafas *et al.*¹⁰⁰, 1995; Gonçalves *et al.*³⁶, 2002; Gomes *et al.*³⁵, 2001). Diante deste fato, verificou-se que vários trabalhos na literatura relatam a importância da matriz dentinária desmineralizada como material de enxerto osteoindutor e/ou osteopromotor (Catanzaro-Guimarães *et al.*²¹, 1986; Alper *et al.*⁴, 1989; Carvalho¹⁹, 2001; Gomes *et al.*^{35, 34}, 2001, 2002; Gomes *et al.*³³, 2002).

Estudos têm demonstrado a formação de tecido ósseo e cartilaginoso após o enxerto de dentina desmineralizada na região intramuscular de animais experimentais. Este fenômeno ocorre devido à presença de substratos osteoindutores na dentina (Bang⁶, 1972; Butler *et al.*¹⁵, 1977; Gould *et al.*³⁷, 1982; Kawai & Urist⁵⁴, 1989).

Butler *et al.*¹⁵ (1977) removeram os componentes solúveis presentes na matriz dentinária desmineralizada de rato sem prejudicar a atividade da BMP e caracterizaram as proteínas não colágenas (NCP) que permaneceram na matriz insolúvel. Neste estudo, os autores verificaram que a matriz dentinária desmineralizada mostrava atividade da proteína morfogenética óssea, pois

permitiu a indução da formação de cartilagem e osso quando enxertada em região intramuscular de ratos. A partir deste trabalho, a atividade da BMP foi atribuída às proteínas não colágenas do osso e da dentina e, então, a natureza destas proteínas da dentina de ratos foi examinada. Após o tratamento da matriz dentinária desmineralizada com collagenase bacteriana purificada, três NCP foram solubilizadas concomitantemente, com a digestão do colágeno da dentina para peptídeos menores. Das três proteínas separadas, duas eram ricas em aspartato, glutamato, glicina, serina e alanina e, desta forma, exibiam composições similares às das proteínas acídicas de outros tecidos conjuntivos. A terceira NCP mostrava composição de aminoácidos como aspartato e fosfoproteínas ricas em serina, as quais encontravam-se principalmente na forma solúvel na dentina de rato. Os autores notaram que a atividade da BMP da dentina desmineralizada de rato, similar àquela encontrada no tecido ósseo, estava presente no tecido após remoção dos principais componentes solúveis.

Kawai & Urist⁵⁴ (1989) implantaram frações de proteínas não colágenas (NCP) de dente descalcificado, no músculo de camundongo. Estas frações protéicas foram extraídas de dentes bovinos em três diferentes estágios de evolução: germe dentário, dente não erupcionado e dente erupcionado. A atividade osteoindutora de cada fração protéica, dos respectivos elementos dentários, foi mensurada por meio da análise de imagem computadorizada, após a sua implantação. Induziram formação óssea, 71% a 83% dos 41 implantes de fração de NCP de dente descalcificado. A quantidade de formação óssea foi maior quando se implantou fração de NCP, de dentes não erupcionados, quando comparada com a fração de NCP de dentes erupcionados. Diante dos resultados, os autores sugeriram que os dentes bovinos têm uma seleção de proteínas osteoindutoras comparáveis à BMP bovina.

Inoue *et al.*⁴⁷ (1989) compararam o papel osteoindutor da dentina desmineralizada enxertada *in vivo* no tecido muscular, no tecido conjuntivo subcutâneo, na cavidade medular do fêmur e no ligamento periodontal de ratos, ao do osso desmineralizado enxertado nestes mesmos tecidos. Neste estudo, os

autores observaram a ocorrência de osteoindução em todos os tecidos enxertados e relataram haver indução da condrogênese *in vivo* por enxerto de dentina desmineralizada, ocorrendo mais rapidamente e em maior quantidade no tecido muscular, seguida do tecido conjuntivo subcutâneo, cavidade medular do fêmur e por fim, num processo mais lento, no ligamento periodontal de ratos.

Além da dentina desmineralizada induzir a formação óssea em áreas heterotópicas e ortotópicas (Nakashima^{73, 71, 72, 70}, 1990, 1990a, 1992, 1994), Sovieiro *et al.*⁹⁴ (1998) e Torres *et al.*⁹⁹ (2000) verificaram a diferenciação de células ectomesenquimais em odontoblastos na polpa dentária de cães, após o enxerto de matriz dentinária desmineralizada ou da BMP parcialmente purificada. Os autores como Tziafas *et al.*¹⁰⁰ (1995) sugerem ainda que a matriz dentinária enxertada, poderia constituir uma superfície adequada para a fixação das células mesenquimais indiferenciadas, auxiliando a orientação celular e induzir a diferenciação das células ectomesenquimais em células semelhantes a odontoblastos na polpa dentária de molares de cães, promovendo a sua polarização ou a secreção de uma zona intermediária de matriz.

Gould *et al.*³⁷ (1982) sugerem a utilização de gelatina de matriz dentinária, como um material de enxerto universal em cirurgias periodontais. Os autores utilizaram matriz dentinária desmineralizada homogênea em defeitos ósseos de tamanho crítico no osso parietal de ratos. Decorridas duas, quatro, oito e dez semanas, a análise microscópica permitiu observar que o processo de reparo ósseo foi completo em todos os períodos de observação do grupo tratado, enquanto que, no grupo controle, o defeito foi reparado por cicatrização fibrosa. Os pesquisadores concluíram, então, que a gelatina de matriz dentinária homogênea parece ter um forte potencial osteoindutor.

Catanzaro-Guimarães *et al.*²¹ (1986) enxertaram matriz dentinária autógena na forma de fatias e de partículas em defeitos experimentais na mandíbula de cães que posteriormente, foram analisados em microscopia óptica, nos períodos de 15, 30 e 90 dias. No enxerto de partículas de matriz dentinária, observou-se reabsorção e substituição das partículas por formação óssea e na

matriz dentinária em fatias, verificou-se a incorporação das mesmas ao tecido ósseo neoformado. Segundo os autores, os enxertos de matriz dentinária apresentaram algumas propriedades relevantes como: fácil manuseio, facilidade de obtenção, presença de potencial osteoindutor e biocompatibilidade.

Em 1993, Catanzaro-Guimarães²⁰ relatou que enxertos de matriz de dentina desmineralizada, nas mais variadas formas ou apresentações (gel, partículas, fatias, etc.), induziu formação de trabéculas ósseas, cortical e medula óssea em quaisquer sítios de implantação. A osteoindução seria controlada por complexas interações moleculares que atuariam sobre as células osteoprogenitoras derivadas das células mesenquimais, influenciando sua proliferação, migração, ancoragem e, subsequente, a velocidade e duração das células das linhagens osteoblástica e clástica. Sugeriu que a dentina possui BMP lábil e que suas propriedades osteoindutoras estão firmemente associadas com a matriz colagênica.

Gomes *et al.*³⁵ (2001) realizaram estudos sobre os efeitos da associação da matriz dentinária desmineralizada autógena à membrana amniótica humana em defeitos cirúrgicos no osso parietal de coelhos. De acordo com os resultados obtidos neste experimento, concluiu-se que a membrana amniótica humana não interferiu no processo de regeneração óssea e que a reparação do defeito foi acelerada pela presença das fatias de matriz dentinária, as quais foram reabsorvidas durante o processo de remodelação.

Gomes *et al.*³⁴ (2002) avaliaram a atividade osteoindutora da matriz dentinária desmineralizada autógena (MDDA) em defeitos ósseos cirúrgicos tratados pela técnica de regeneração óssea guiada (ROG) associada à utilização da m-PTFE. Os resultados possibilitaram concluir que a m-PTFE não interferiu no processo de regeneração óssea, permanecendo na região de implantação durante todos os períodos e que as fatias de MDDA estimularam a neoformação óssea de forma direta, sendo rapidamente incorporadas ao osso neoformado e reabsorvidas durante o processo de remodelação óssea. Estes autores relataram, ainda, a propriedade quimiotática das fatias de matriz dentinária autógena sobre as células

osteoprogenitoras da região de reparo ósseo como fator acelerador de osteopromoção.

Gomes *et al.*³³ (2002) estudaram o comportamento biológico da matriz dentinária humana no processo de reparo em alvéolos dentários de ratos e verificaram que possui propriedade osteocondutora, sendo biocompatível e diminuindo a reação inflamatória na área experimental.

Abreu *et al.*¹ (2003), avaliaram o comportamento biológico da matriz orgânica dentinária autógena na reparação óssea de alvéolos dentários humanos, concluindo que a mesma possui propriedade osteocondutora, sendo ainda compatível com a regeneração óssea alveolar.

Embora a matriz dentinária desmineralizada autógena tenha sido amplamente empregada experimentalmente em enxertos ósseos variados, poucos trabalhos sobre o uso de matriz dentinária desmineralizada homogênea em enxertos ósseos foram referenciados até o presente momento. Bang⁶ (1972) comparou o grau de antigenicidade da matriz dentinária desmineralizada xenogênica (pertencente a indivíduos de diferentes espécies) com o da matriz dentinária desmineralizada homogênea. Neste estudo, notou-se o alto grau de antigenicidade do enxerto xenogênico, sem a presença de osteoindução, enquanto a matriz dentinária homogênea provocava discreta reação imunológica, evidenciando ainda, certo potencial osteoindutor.

Em 1998, Yoshida *et al.*¹⁰⁹ realizaram estudo histopatológico da biocompatibilidade da matriz dentinária homogênea liofilizada aplicada como barreira biológica na região periapical após pulpectomia em dentes de cães. Após três meses de observação pôde-se constatar a formação de tecido calcificado envolvendo a região periapical, o que demonstra a boa compatibilidade biológica deste material com os tecidos periapicais, indicando sua aplicabilidade clínica.

Em 1999, Okamoto *et al.*⁷⁷ avaliaram os efeitos do enxerto de matriz dentinária homogênea preservada em glicerina a 98%, estocada no máximo por 20 dias, em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. Os resultados após 10, 20, 30, e 60 dias mostraram que a matriz dentinária é parcialmente reabsorvida e

substituída por tecido ósseo neoformado, sobretudo, após 30 a 60 dias. A dentina, portanto, se comportou como material osteoindutor.

Carvalho¹⁹ (2001) utilizou a matriz dentinária desmineralizada homogênea como material de enxerto em defeitos ósseos cirúrgicos em mandíbulas de coelhos, concluindo que a matriz dentinária atuou de forma efetiva na osteopromoção, aumentando significativamente a quantidade de matriz óssea neoformada, apresentando boa tolerância biológica, não obstante o fato de ser um material biológico oriundo de outro indivíduo da mesma espécie.

Hamata *et al.*³⁸ (2002) realizaram estudo histomorfométrico comparativo entre a capacidade osteoindutora da matriz óssea e dentinária homogênea, quando enxertadas na região intramuscular de ratos e concluíram que, as diferenças na composição química e estrutural da matriz óssea e dentinária alteram os mecanismos de osteoindução. Houve formação de cartilagem numa fase intermediária da osteogênese nos animais que receberam enxerto de matriz dentinária, entretanto, a quantidade e a qualidade final do tecido ósseo neoformado foram semelhantes.

Cheng *et al.*²³ (2001) utilizaram a matriz dentinária desmineralizada autógena em reparos de fraturas ósseas decorrentes de traumatismos cranianos em 22 pacientes submetidos à neurocirurgia. O acompanhamento pós-operatório permitiu observar que os pacientes que receberam enxertos de matriz dentinária apresentaram sinais de ossificação sete dias após a cirurgia. Os pacientes apresentaram reparo adequado com compatibilidade ao material de enxerto, sendo este recomendado para o uso em defeitos ósseos de calota craniana.

Kim *et al.*⁵⁶ (2002) avaliaram o efeito de partículas de dentina associadas ou não ao plasma rico em plaquetas (PRP) e aplicadas a defeitos ósseos em cães. Após análise histomorfológica e histomorfométrica os autores puderam concluir que houve a formação de grande quantidade de tecido ósseo nos grupos que receberam os enxertos de partículas de dentina, mesmo quando estas não foram associadas ao PRP. Também Kim *et al.*⁵⁵ (1999) avaliaram o desempenho da dentina particulada associada a emplastro de Paris como material

de enxerto ósseo em defeitos mandibulares de mais de 20mm de diâmetro em humanos. Após análises radiográfica e clínica os pesquisadores concluíram que a mistura de pasta de dentina foi biocompatível e acelerou o processo de regeneração óssea.

3 PROPOSIÇÃO

Devido à escassez de registros na literatura referentes ao uso da matriz dentinária homogênea em forma desmineralizada e liofilizada na regeneração óssea, o presente estudo tem como objetivo desenvolver tecnologia de obtenção da matriz dentinária desmineralizada liofilizada, além de verificar sua efetividade osteopromotora com o material de enxerto homogêneo na regeneração óssea de defeitos cirúrgicos em mandíbulas de coelhos, por meio de análises macroscópica, histomorfológica e histomorfométrica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para o presente trabalho, foram utilizados dezoito coelhos brancos, adultos jovens (de três a cinco meses de vida) da raça *New Zealand*, com peso médio de 3,5kg, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu – UNESP. Estes foram divididos em dois grupos, sendo nove animais para o grupo controle (grupo **A**) e nove animais para o grupo tratado (grupo **B**). Em todos os grupos, foi confeccionado um defeito ósseo de 5mm de diâmetro na região compreendida entre os terceiros e quartos molares inferiores direitos, sendo que no grupo **A** o defeito ósseo foi recoberto apenas por membrana de politetrafluoretileno (m-PTFE) e no grupo **B**, a matriz dentinária desmineralizada homogênea liofilizada (MDDH-L) foi posicionada no contorno da loja cirúrgica e esta recoberta por m-PTFE (Figura 1).

Os referidos animais foram submetidos a um período de observação de um mês e mantidos em gaiolas individuais com dieta de ração balanceada e água *ad libitum*, conforme aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (Anexo 2).

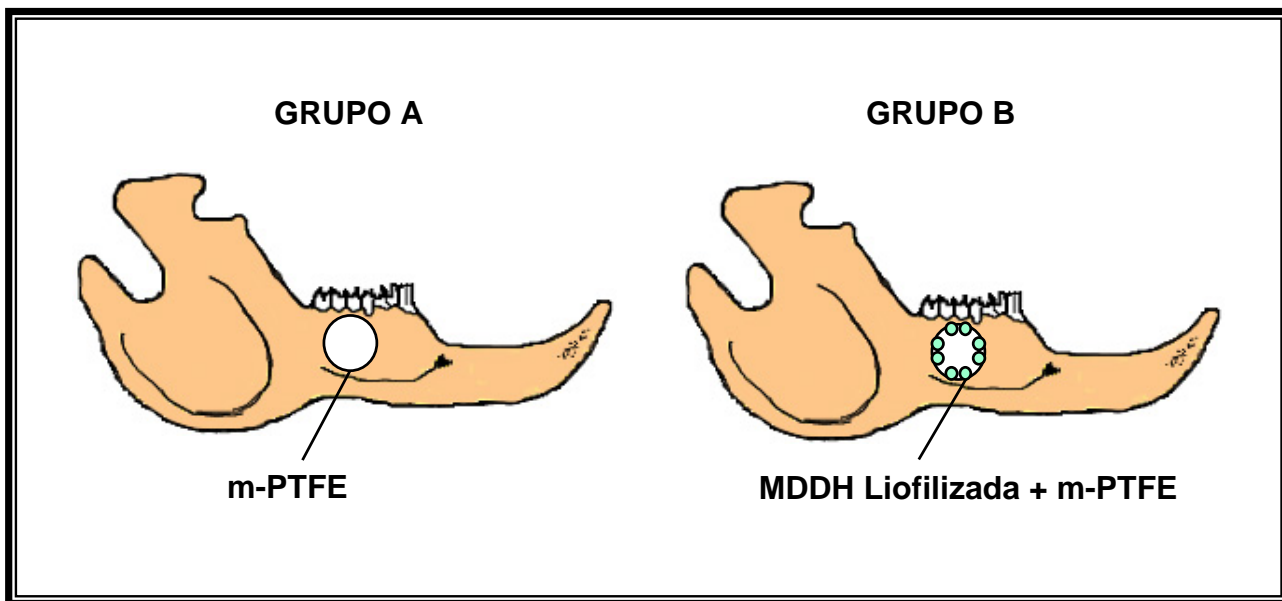


Figura 1 - Desenho esquemático do defeito ósseo cirúrgico em mandíbula de coelho dos grupos controle (**A**) e tratado (**B**).

4.2 PREPARAÇÃO DA MATRIZ DENTINÁRIA DESMINERALIZADA LIOFILIZADA

A matriz dentinária foi obtida a partir de trinta e seis incisivos centrais superiores e inferiores extraídos do grupo controle, alguns minutos antes do sacrifício dos mesmos. Para isto, os dentes foram despulpados por via retrógrada e os resíduos do ligamento periodontal removidos por raspagem da raiz. Após lavagem com soro fisiológico estéril (NaCl a 0,9%) a 2^oC, os dentes foram secos em estufa a 37°C. A face lingual que contém o cimento, tanto da coroa, quanto da raiz foi removida por desgaste com o uso de broca cilíndrica diamantada.

Posteriormente, os dentes foram triturados em grau e pistilo de alto impacto, manualmente. O pó obtido na trituração foi peneirado em telas graduadas (Telateste – Ind. Brasileira) cujos orifícios apresentam diâmetros decrescentes, sendo que o diâmetro final das partículas foi de aproximadamente 0,105mm (Figura 3A).

4.2.1 SEPARAÇÃO QUÍMICA ENTRE ESMALTE E DENTINA

Na seqüência, o material obtido, consistindo de 13,43g de pó de dente, foi submetido a processo químico com o objetivo de separar esmalte e dentina com base na diferença de densidade existente entre estas duas estruturas (esmalte: $d = 3,00\text{g/mL}$ e dentina: $d = 2,14\text{g/mL}$). Para isto, foi utilizada uma solução contendo 8% de acetona e 92% de bromofórmio P.A, cuja densidade final foi de aproximadamente 2,7g/mL (Asgar⁵, 1956).

Utilizando-se um tubo de centrífuga graduado, o pó de dente foi imerso na solução de bromofórmio e acetona na proporção de 1g de pó para 7mL da solução separadora. Após este processo, verificou-se a sedimentação de esmalte e a permanência da dentina na parte superior da fase sobrenadante. A fase contendo o pó dentinário foi removida com micropipeta, transferida para uma placa

de Petri e levada à capela para a completa evaporação da solução desmineralizadora. O rendimento deste processo de separação foi de aproximadamente 67% da massa inicial de pó de dente, ou seja, 9,0g de pó de dentina que foi submetida à desmineralização (Figura 3A).

4.2.2 DESMINERALIZAÇÃO DO PÓ DE DENTINA

A massa do pó de dentina foi dividida em duas porções iguais de 4,5g, que foram colocadas em duas membranas de diálise com poros de 12.000kD (kiloDaltons). As membranas de diálise foram imersas, separadamente, em recipientes contendo 500mL da solução desmineralizadora preconizada (Itthagarun & Wei⁵⁰, 2000) contendo ácido acético ($C_2H_4O_2$ – 0,5mM – 2,87mL/L), cloreto de cálcio ($CaCl_2$ – 2,2 mM – 244,2mg/L) e fosfato de sódio monohidratado (NaH_2PO_4 – 2,2mM – 349,14mg/L), cujo pH final foi ajustado para 5,0 e mantida à temperatura ambiente. O processo de desmineralização promoveu a liberação de íons cálcio (Ca^{+2}) e fosfato (PO_4^{-3}) e a difusão destes para a solução desmineralizadora. A concentração de íons fosfato foi, então, dosada a cada troca da referida solução, o que ocorreu a cada 72 horas. Paralelamente foi dosada a concentração de íons fosfato na solução desmineralizadora antes da imersão do dispositivo de diálise (Figura 3A).

4.2.3 DOSAGEM DOS ÍONS FOSFATO

O teor de fosfato na solução desmineralizadora inicial e após 72 horas de imersão da dentina foi determinado pelo método de Chen *et al.*²² (1956) onde o fosfato reage com o molibdato de amônio formando fosfomolibdato de amônio, que em seguida é reduzido pelo ácido ascórbico a óxido de molibdênio de cor azul e cujas absorbâncias das amostras foram registradas a 820nm em

espectrofotômetro Shimadzu série UV-1200. Para tal, foi levantada, previamente, uma curva padrão com soluções contendo 10, 20, 30 e 40µg/mL de íons fosfato. As médias das absorbâncias destas soluções, em duplicata, foram utilizadas para calcular o fator de calibração ($F_c=13,99$) de acordo com a seguinte expressão:

$$F_c = \frac{\text{concentração padrão do íon}}{\text{absorbância padrão}}$$

Também foram registradas, em duplicatas, as absorbâncias das amostras de solução desmineralizadora antes e após diálise e as concentrações de íons fosfato obtidas segundo a expressão:

$$[amostra] = F_c \times \text{Absorbância média da amostra}$$

As dosagens de íons fosfato foram realizadas até que se constatou valores idênticos de absorbância para as soluções antes e após a desmineralização completa da dentina (Figura 3A), ou seja, quando as concentrações de íons na solução antes e após 72 horas de desmineralização tornaram-se idênticas conforme observado no gráfico da figura 2.

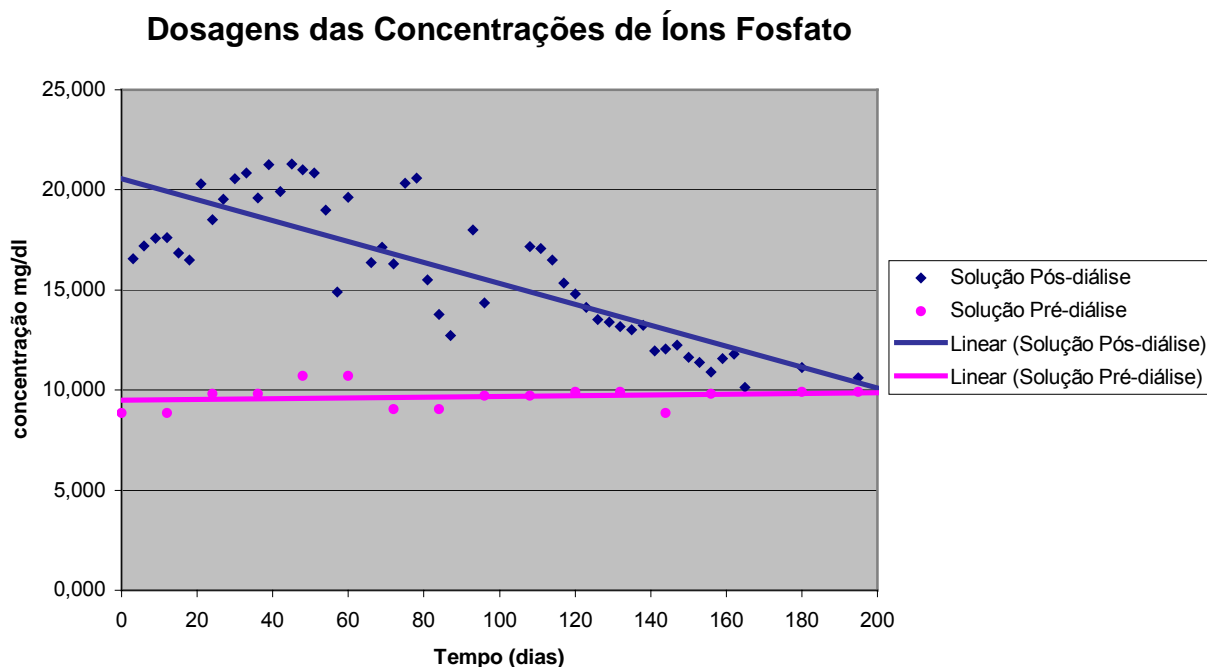


Figura 2 - Dosagens das concentrações de íons fosfato nas soluções pré e pós-diálise.

4.2.4 DETECÇÃO DE PROTEÍNAS E OLIGOPEPTÍDEOS

Com o objetivo de avaliar o conteúdo protéico e de oligopeptídeos da solução desmineralizadora, foram utilizados os métodos de Lowry *et al.*⁵⁸ (1951) e da reação do biureto respectivamente. O método de Lowry foi utilizado para dosar o conteúdo protéico da solução desmineralizadora. As absorbâncias registradas nas amostras da solução desmineralizadora, testadas pelo método de Lowry, foram idênticas às absorbâncias dos brancos constituídos de alíquotas da amostra de solução desmineralizadora antes da diálise e, portanto, livres de material protéico.

A reação do biureto consiste na reação de sulfato de cobre (CuSO_4) em meio básico com compostos contendo pelo menos duas ligações peptídicas.

Dessa forma, as proteínas e oligopeptídeos a partir de tripeptídeos apresentam reação positiva, ou seja, coloração azul. As reações do biureto das amostras deram negativas, evidenciando ausência total de proteínas e oligopeptídeos nas soluções desmineralizadoras coletadas a cada 72 horas.

4.2.5 DETECÇÃO DE AMINOÁCIDOS

A análise qualitativa de aminoácidos livres que, eventualmente, poderiam estar presentes na solução desmineralizadora pós-diálise foi realizada pela reação com ninidrina, a qual reage com o grupo amino dos aminoácidos, a quente e em pH superior a 4,0, dando origem ao composto púrpura de Ruhemann.

Os resultados das reações com ninidrina para as amostras de solução desmineralizadora coletadas a cada 72 horas, foram sempre negativos, evidenciando a não difusão de aminoácidos através da membrana de diálise e também a ausência de hidrólise das proteínas da dentina durante o processo de desmineralização.

4.2.6 LIOFILIZAÇÃO DA MATRIZ DENTINÁRIA DESMINERALIZADA

Após a completa desmineralização da dentina, o conteúdo da membrana de diálise foi centrifugado para a completa sedimentação do material. Após a centrifugação, a dentina desmineralizada foi isolada e levada à estufa a 37°C para evaporação da solução desmineralizadora remanescente. A matriz dentinária desmineralizada, seca em estufa, foi levada ao liofilizador modelo MLW-LG-05, à temperatura de - 40°C durante 6 horas, até completa liofilização do material. A quantidade de material resultante foi de 1,5g de matriz dentinária desmineralizada (Figura 3B).

4.2.7 ESTERILIZAÇÃO DA MATRIZ DENTINÁRIA DESMINERALIZADA

O processo de esterilização da matriz dentinária desmineralizada foi realizado pela irradiação por Cobalto-60 (^{60}Co), no irradiador modelo JS7500 da EMBRARAD (Empresa Brasileira de Radiações Ltda.), dentro dos procedimentos especificados pelo fabricante do equipamento (Nordion-Canadá), levando-se em conta a quantidade e a natureza do material a ser irradiado (Figura 3B). A dose de irradiação absorvida pelo material foi de 20kGy (kiloGray), que corresponde à dose mínima necessária para se obter a esterilização do material estudado.

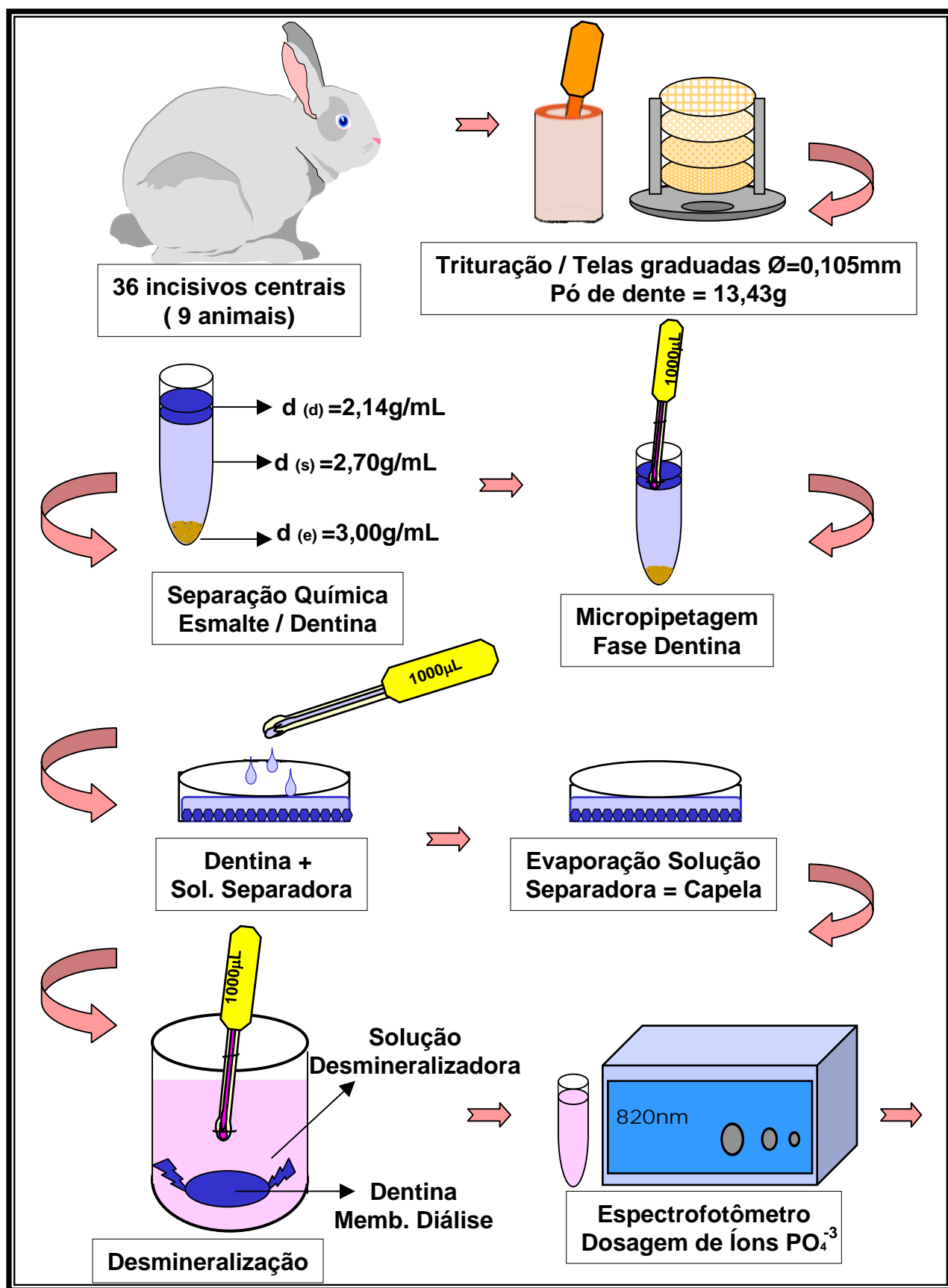


Figura 3A – Desenho esquemático representando o processo de preparação da MDDH-L.

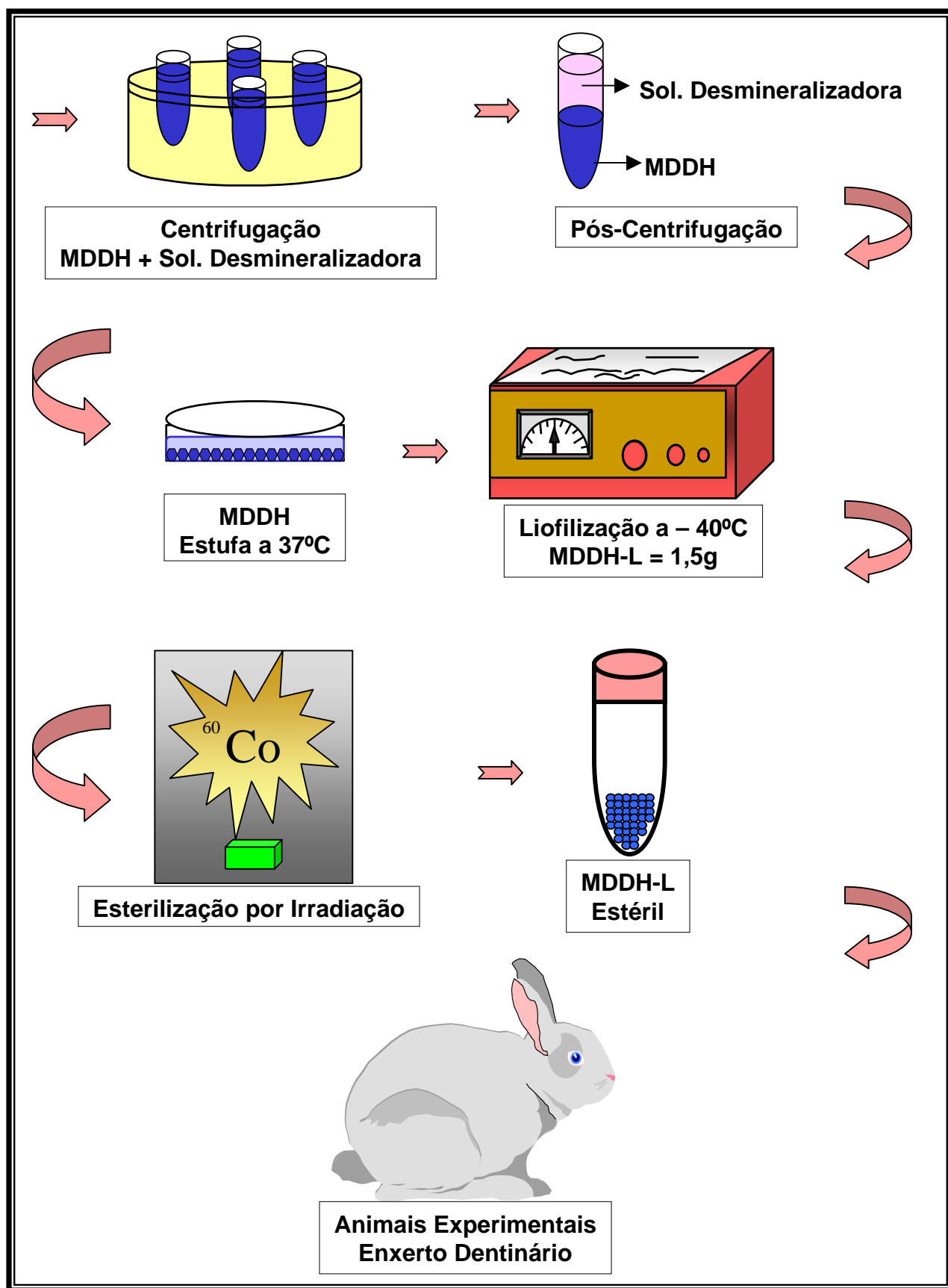


Figura 3B – Desenho esquemático representando o processo de preparação da MDDH-L (continuação).

4.3 PREPARO DO ANIMAL, CONFECÇÃO DO DEFEITO ÓSSEO CIRÚRGICO E ENXERTO DA MDDH-L

Os animais receberam antibiótico Pentabiótico de uso veterinário para animais de pequeno porte (Fort Dodge) que consiste numa associação de benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina potássica, diidroestreptomicina e sulfato de estreptomicina, por via intramuscular 24 horas antes e 1 hora após o procedimento cirúrgico na dose de 0,1mg/kg, conforme indicado pelo fabricante.

A anestesia foi realizada por via intramuscular e os medicamentos utilizados foram uma associação do pré-anestésico cloridrato de 2 - (2,6 - xilidino) - 5,6 - dihidro - 4H - 1,3 tiazina (Rompum - fr. 100mL - Parker-Davis), com o anestésico geral cloridrato de cetamina (Ketamina - fr/amp. 10mL - Parke-Davis). As dosagens médias referenciais do pré-anestésico e anestésico geral foram 0,25mg/kg e 0,35mg/kg respectivamente. O pré-anestésico foi aplicado 15 minutos antes do anestésico. Após estes procedimentos, os animais experimentais foram colocados em posição de decúbito lateral sobre uma mesa cirúrgica para a realização da tricotomia, anti-sepsia com Polivinilpirrolidona-iodo / PVPI (Polvidine solução tintura - Parke-Davis) e posicionamento do campo fenestrado (Figura 4A). Em seguida, administrou-se cloridrato de prilocaína a 3% com felipressina 0,03U.I., solução injetável (Citanest – Merrell-Lepetit) para anestesia local e obtenção da vasoconstricção na região onde foram realizados os defeitos ósseos, nos animais experimentais.

Posteriormente, foram feitas incisões na pele na região do corpo da mandíbula do lado direito dos animais, bem como afastamento da musculatura mastigatória até expor a cortical óssea vestibular (Figura 4B). Imediatamente após, confeccionou-se um defeito ósseo de forma circular com 5mm de diâmetro em cada um dos animais, na região compreendida entre os terceiros e quartos molares, utilizando-se uma broca tipo Trefina de 5mm de diâmetro da marca Dentoflex, com irrigação constante de soro fisiológico estéril (Figura 4C). A

espessura do referido defeito correspondeu à da cortical óssea vestibular, atingindo superficialmente as raízes dentárias inferiores. Após a obtenção do defeito ósseo, no grupo **B** foi utilizada a MDDH-L associada à m-PTFE a qual foi suturada ao periósteo adjacente ao defeito (Figuras 4D e E) e no grupo **A** a loja cirúrgica foi recoberta pela m-PTFE (Figuras 4C e E). Em seguida, procedeu-se o posicionamento e sutura dos músculos mastigatórios e da pele, com fio de sutura absorvível Vycril (Johnson & Johnson 6-0) e fio de sutura de seda agulhado (Johnson & Johnson 4-0) respectivamente. (Figura 4F).

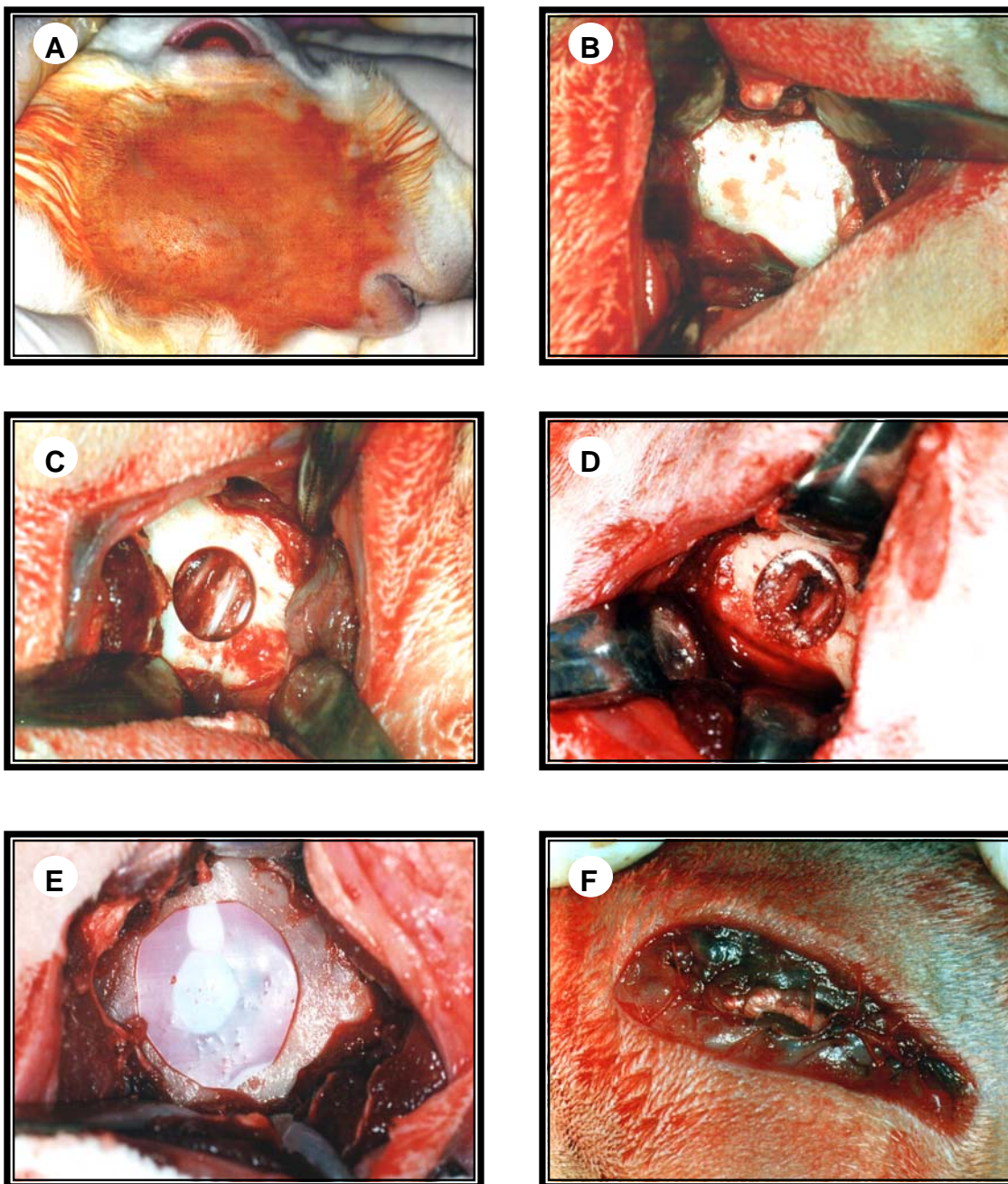


Figura 4 - Procedimento cirúrgico:
A - tricotomia e assepsia;
B - incisões da pele e musculatura e exposição da cortical óssea vestibular;
C - defeito ósseo;
D - MDDH-L na periferia do defeito;
E - m-PTFE recobrindo o defeito ósseo;
F - sutura dos músculos mastigatórios e do tecido subcutâneo.

4.4 PERÍODO EXPERIMENTAL

No final dos procedimentos cirúrgicos, bem como durante três dias consecutivos após a cirurgia, todos os animais receberam solução injetável de analgésico e antiinflamatório diclofenaco de sódio (Voltaren / Parker-Davis) por via intramuscular, na dosagem de 0,6mg/kg.

Decorridos 30, 60 e 90 dias, três animais de cada grupo foram sacrificados periodicamente por superdosagem de barbitúrico (Pentobarbital sódico – 60mg/kg).

4.5 ANÁLISE MACROSCÓPICA

As hemimandíbulas contendo o defeito ósseo foram removidas em bloco para a análise da região do defeito cirúrgico quanto aos aspectos macroscópicos de dimensão, consistência, coloração e forma. Estas observações foram registradas e fotografadas.

4.6 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

Para o estudo histomorfológico, as peças foram fixadas em formol a 10% por 72 horas e desmineralizadas em solução aquosa de EDTA 0,2M (Merck S.A. Industrias Químicas), segundo a técnica de Warshawsky & Moore¹⁰⁶ (1967), a qual era substituída a cada 24 horas e agitada três vezes ao dia, por um período aproximado de 120 dias, após o que foram processadas e incluídas em parafina. Os cortes foram feitos com 5µm de espessura e as lâminas foram preparadas pelas técnicas histológicas rotineiras para coloração com hematoxilina-eosina. Em seguida, as lâminas foram analisadas pela microscopia de luz convencional para estudo histomorfológico.

4.7 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Para a realização da histomorfometria, utilizou-se o método estereológico, que consiste em determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de cortes histológicos por meio da geometria e da estatística (Mandarim-de-Lacerda⁶¹, 1995). A finalidade da aplicação deste método é estudar uma determinada amostra de cortes aleatórios e isotrópicos.

Considerando que o princípio experimental da estereologia está na casualização das amostras, a escolha das mesmas deve ser realizada por um método que elimine a ocorrência de vícios na amostragem, consistindo na aplicação de procedimentos de casualização em todas as fases do experimento, tais como: seleção aleatória dos animais, dos blocos histológicos, das lâminas, dos cortes histológicos presentes em cada lâmina e, principalmente, dos campos microscópicos a serem utilizados nas quantificações (Taga & Stipp⁹⁷, 1994).

Neste estudo, utilizou-se o programa KS400 (Kontron Eletronik Germany, Kontron Corporate, Munik), responsável pela elaboração de um sistema teste específico. O sistema selecionado consistiu num retículo composto por 70 quadriláteros, apresentando área de $10 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ cada um, e por 54 pontos que representavam a intersecção das linhas que compõem os quadrados. Este retículo foi sobreposto às imagens dos campos histológicos, sendo estas analisadas num aumento original de 100x ao microscópio de luz convencional (Axiolab - Zeiss LR 66238 C, Kontron Eletronik Germany, Kontron Corporate, Munik). As imagens obtidas foram captadas por uma câmera de vídeo (Hyper Had Sony – CCD – IRIS – RGB – Color video camera) e transferidas para um monitor de alta resolução.

O número mínimo de cortes histológicos para esta análise foi obtido por meio do Método de Frequência Acumulada (Weibel¹⁰⁷, 1979), que se caracteriza pela determinação empírica do número mínimo de observações para construir uma amostra adequada às medições. Baseado neste método, obtiveram-se nove cortes histológicos, com três campos microscópicos em cada corte, por animal.

Esta técnica foi aplicada em todos os grupos de estudo, com o propósito de quantificar a matriz óssea neoformada dentro dos períodos considerados.

Segundo o sistema, a contagem morfométrica foi obtida pela quantificação do número de pontos que incidiram sobre as trabéculas óssea neoformada. Seus valores foram transformados em densidade de volume que representa a fração de volume ocupada por um objeto numa determinada estrutura, expressa em porcentagem (Mandarim-de-Lacerda⁶¹, 1995), segundo a fórmula:

$$\text{Densidade de volume (Vvi)} = \frac{\text{Pmo (nº de pontos sobre matriz óssea neoformada)}}{54 \text{ (nº total de pontos do sistema teste)}} \times 100 \%$$

Os valores desta contagem foram tabelados para análise estatística. Os resultados assim obtidos foram, neste caso, submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey (Vieira¹⁰⁵, 1999), com o nível mínimo de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

Para facilitar a descrição dos resultados obtidos na análise macroscópica das peças dos grupos experimentais **A** e **B**, os defeitos cirúrgicos, foram divididos em porções central e periférica (Figura 5).

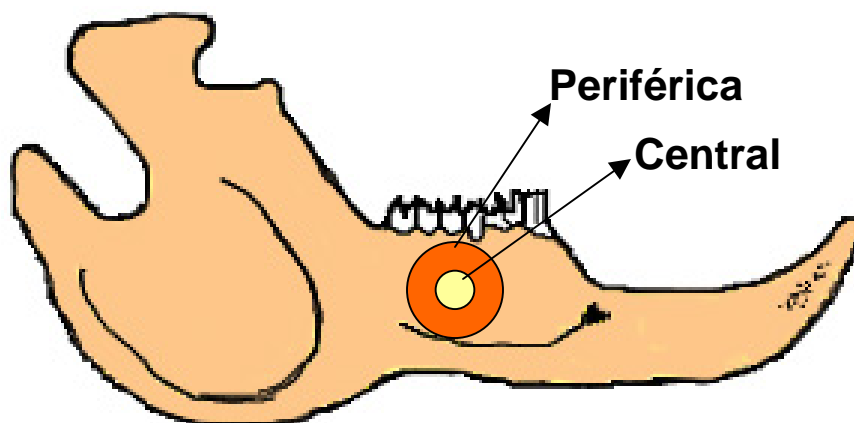


Figura 5 – Desenho esquemático do defeito ósseo confeccionado na mandíbula de coelhos.

5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Os espécimes foram estudados pela face vestibular após a dissecação e remoção da pele e tecidos subcutâneo e muscular. A região do defeito ósseo, localizado na hemimandíbula direita do animal, foi analisada quanto à sua coloração, quantidade de osso neoformado, consistência do tecido de preenchimento e grau de regularidade de sua superfície (Figuras 6, 7 e 8).

5.1.1 PERÍODO DE 30 DIAS

No grupo **A** (Figura 6A), a região do defeito apresentou-se distinguível das áreas adjacentes devido à coloração acastanhada. Em dois terços dos animais utilizados, notou-se uma depressão acentuada na porção central, exibindo maior quantidade de tecido mole do que osso, promovendo uma falta de resistência ao toque. A região periférica apresentou consistência firme. A superfície da região do defeito era rugosa nas porções central e periférica posterior com depressões rasas dispersas na região.

No grupo **B** (Figura 6B), a coloração da região de reparo ósseo mostrou-se totalmente compatível com o aspecto e coloração das regiões adjacentes. A consistência da região observada foi dura ao toque em toda a sua extensão, denotando-se o total preenchimento ósseo da loja cirúrgica, além de apresentar-se com regularidade em sua superfície, sobretudo na região central.

5.1.2 PERÍODO DE 60 DIAS

No grupo **A** (Figura 7A), a região da loja cirúrgica apresentou-se ainda distinguível e com limites perceptíveis a olho nu. Nessa região, uma coloração ligeiramente acastanhada foi observada e uma consistência dura na região periférica e friável e/ou quebradiça na sua porção central, evidenciando a presença de tecido mole. Sua superfície revelou-se côncava, apresentando-se predominantemente rugosa.

No grupo **B** (Figura 7B), a região do defeito ósseo foi quase imperceptível ao exame macroscópico. A coloração da região em questão mostrou-se compatível com o aspecto e coloração das regiões adjacentes. A

consistência da região observada foi dura ao toque em toda a sua extensão, apresentando uma ligeira depressão central e uma certa irregularidade na porção periférica anterior, além de canais medulares evidentes, também na região anterior.

5.1.3 PERÍODO DE 90 DIAS

No grupo **A** (Figura 8A), a região da loja cirúrgica apresentou limites precisos, com concavidade uniforme da periferia para o centro do defeito. A região do defeito cirúrgico foi preenchida apenas superficialmente por osso, visto que, ao toque este tecido superficial revelou-se friável e quebradiço, rompendo-se facilmente e denotando a presença de tecido mole subjacente ao recobrimento ósseo superficial. Esta baixa resistência ao toque foi identificada, sobretudo, na porção periférica inferior. Toda a superfície do defeito mostrava aspecto rugoso, além de sua coloração ser diferente, tendendo ao castanho em relação à superfície adjacente.

No grupo **B** (Figura 8B), a região do defeito ósseo apresentou-se indistinguível em seus limites das demais regiões do osso mandibular. A coloração da região de reparo ósseo mostrou-se totalmente compatível com o aspecto e coloração das regiões adjacentes. Observou-se que a consistência da região do defeito era dura ao toque em toda a sua extensão, denotando-se o total preenchimento ósseo da região de reparo, além de apresentar-se com regularidade em sua superfície, sobretudo na região central correspondente ao defeito, onde a superfície óssea mostrou-se lisa.

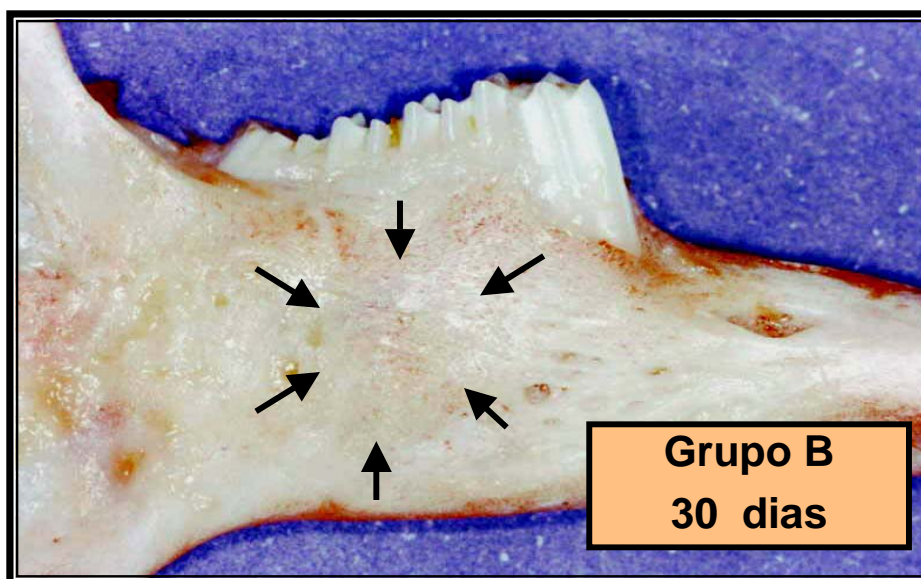
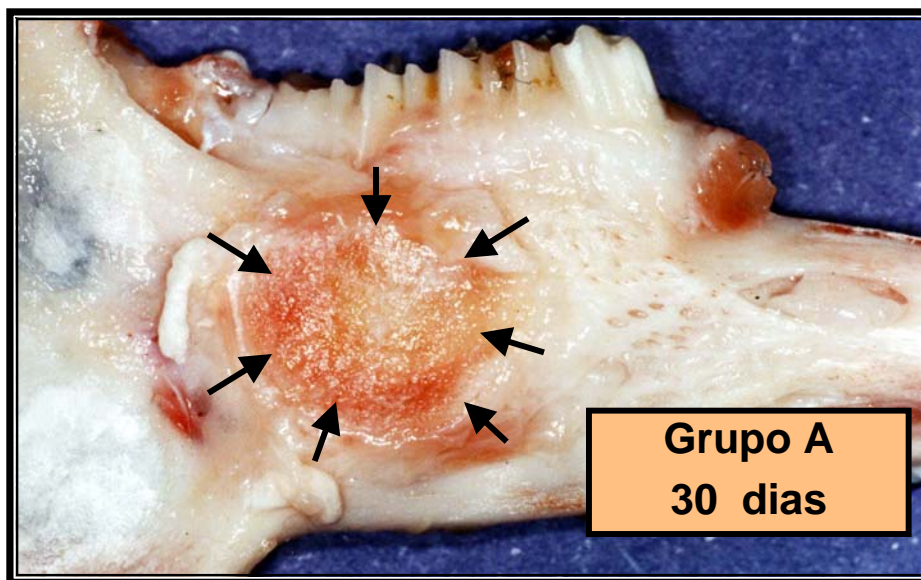


Figura 6 - Fotos das hemimandíbulas de coelhos, mostrando a reparação óssea dos defeitos cirúrgicos aos 30 dias de observação (setas).

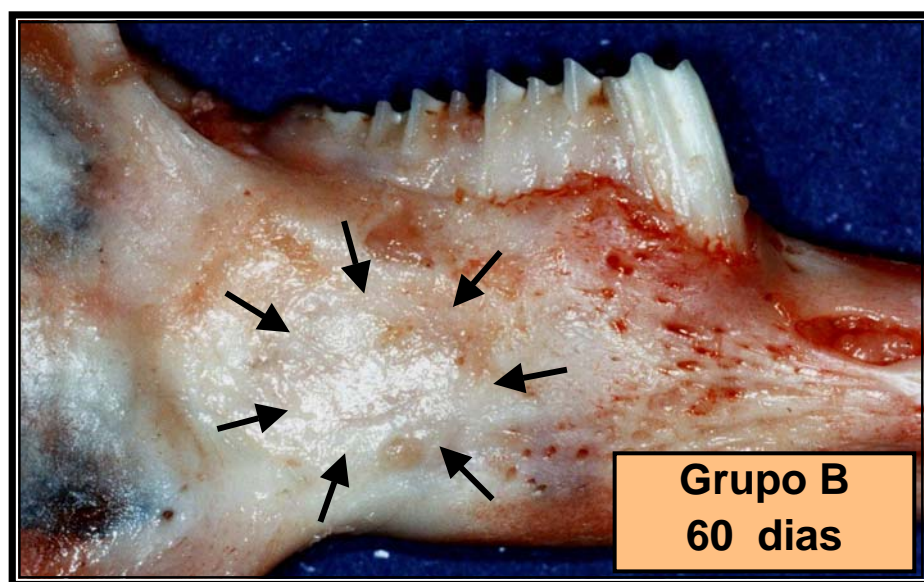
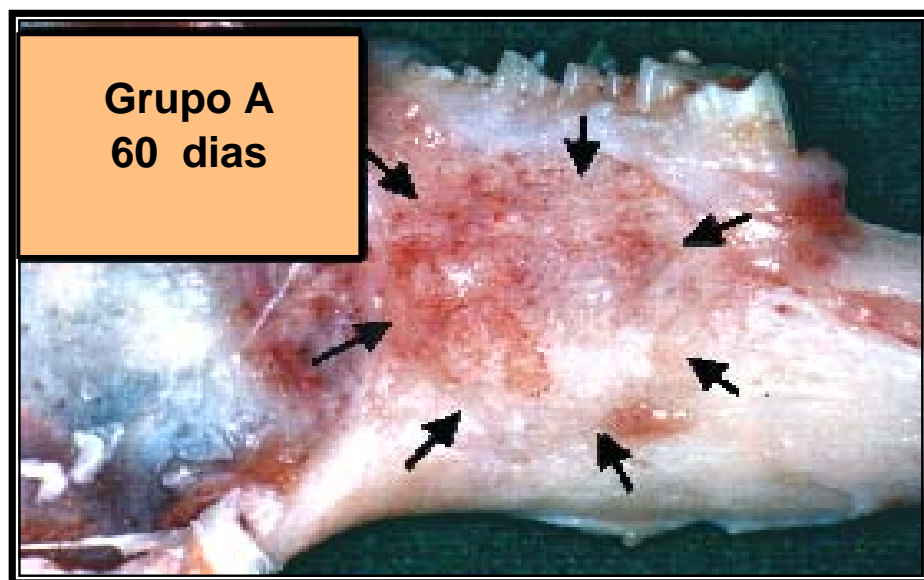


Figura 7 - Fotos das hemimandíbulas de coelhos, mostrando a reparação óssea dos defeitos cirúrgicos aos 60 dias de observação (setas).

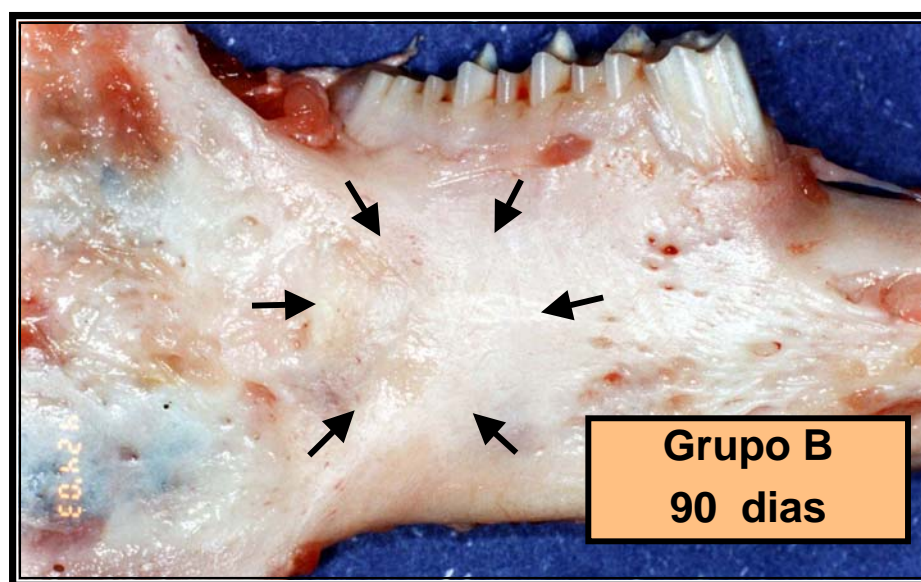
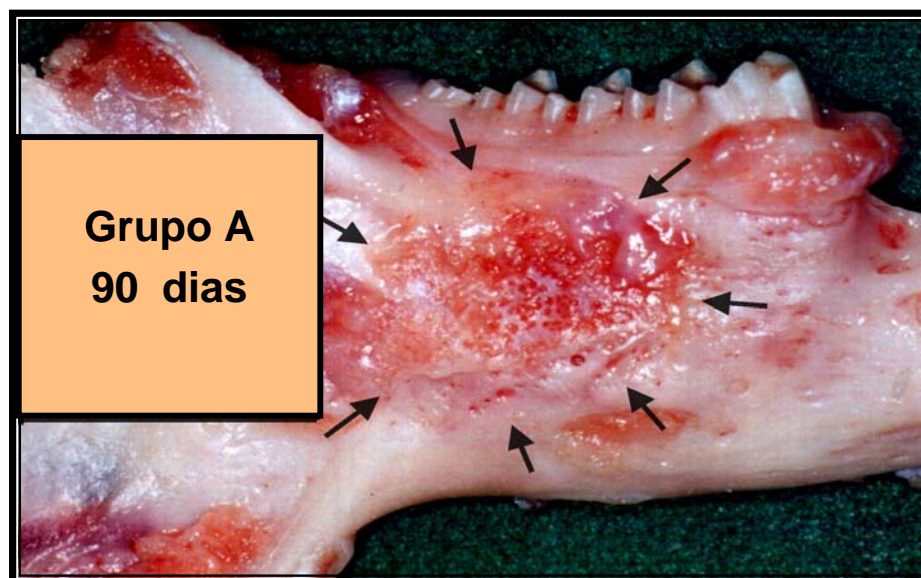


Figura 8 - Fotos das hemimandíbulas de coelhos, mostrando a reparação óssea dos defeitos cirúrgicos aos 90 dias de observação (setas).

5.2 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

Os resultados da análise histomorfológica se referem aos grupos experimentais **A** e **B** analisados em conjunto dentro de cada período considerado no experimento.

5.2.1 *PERÍODO DE 30 DIAS*

No grupo **A**, a área do defeito ósseo cirúrgico apresentou-se preenchida por tecido conjuntivo osteogênico pouco celularizado e frouxo, sobretudo na região central, composto de células fusiformes longas, aparentemente osteoformadoras. Trabéculas ósseas imaturas, irregulares e delicadas, estavam presentes em toda a superfície e extensão do defeito. As trabéculas da porção central eram mais finas, entrelaçadas, delicadas e menos numerosas quando comparadas com as das regiões periféricas do defeito. (Figuras 9A, 10A e B).

No grupo **B**, a região do defeito mostrou-se, em sua maior parte, preenchida por tecido ósseo, sobretudo em sua superfície, onde houve a formação de faixa de tecido de espessura igual ou maior à cortical anterior, constituída de trabéculas ósseas imaturas. Numa visão panorâmica do defeito, notou-se que a neoformação óssea apresentava um crescimento homogêneo e uma certa organização na disposição das trabéculas celularizadas (Figuras 9B, 10C e D).

Nas regiões entre as trabéculas ósseas neoformadas e na região medular abaixo destas, o tecido conjuntivo osteogênico presente mostrou-se abundantemente celularizado (Figuras 11A e 14C), evidenciando intensa atividade neoformadora, grande quantidade de matriz osteóide recém depositada com remodelação simultânea da mesma (Figuras 12A e B, 13A, 14B, C e D). O referido tecido osteogênico também apresentava inúmeras partículas basofílicas de MDDH-L distribuídas irregularmente e em variados estágios de desintegração. Estas partículas exibiam em torno de si um acúmulo significativo de células

osteogênicas ativas (Figuras 11A, B, C e D). A presença de grande quantidade de osteoblastos (Figuras 12A, B e D, 13D, 14A, B e D) e osteoclastos (Figuras 12A, B, C e D, 13D e 14D) evidenciavam intensa atividade osteogênica, bem como expressiva atividade remodeladora do tecido ósseo neoformado. Trabéculas ósseas neoformadas apresentavam incorporação de partículas de MDDH-L (Figuras 13B, 14A e B).

Em um dos espécimes formou-se cartilagem hialina na região periférica do defeito ósseo em continuidade ao tecido ósseo neoformado (Figura 13C).

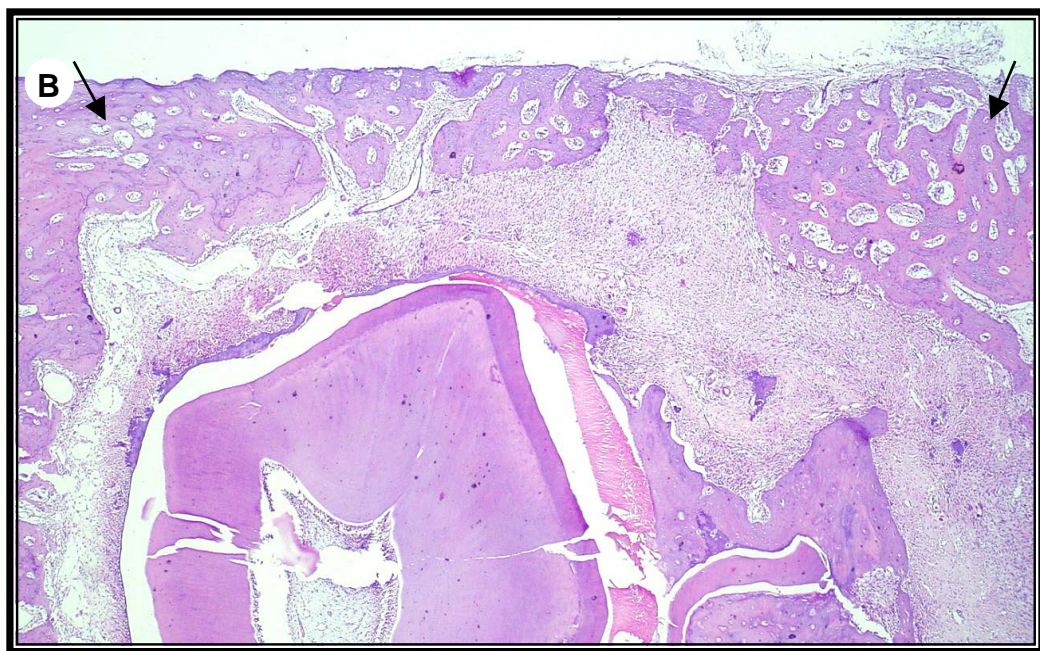
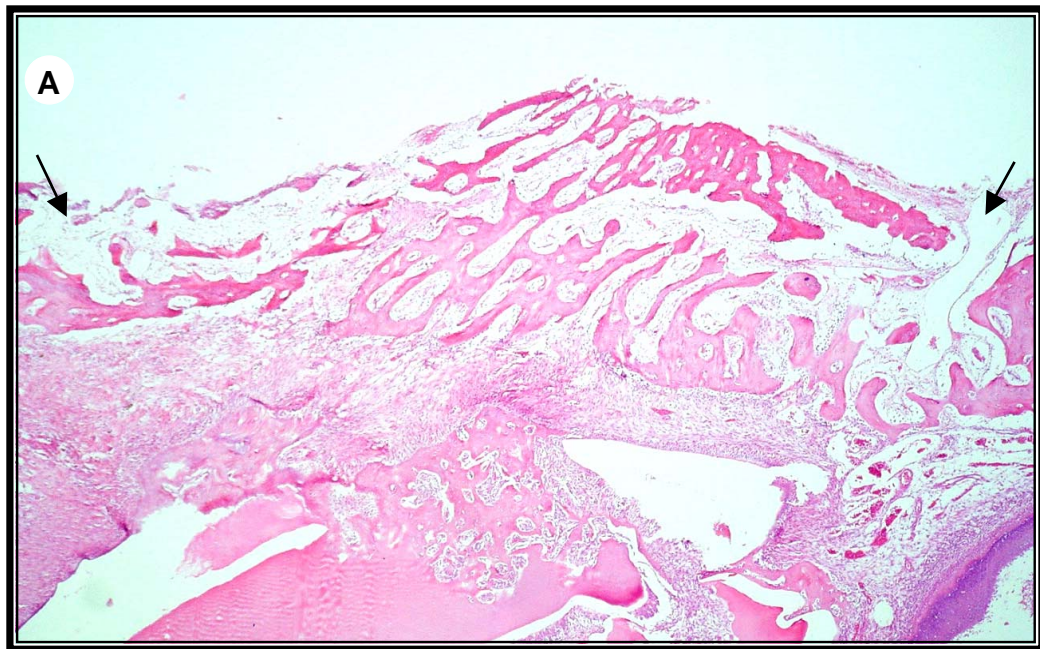


Figura 9 - Grupo controle - 30 dias: A - Trabeculado ósseo preenchendo parcialmente o defeito. Setas indicam os limites do defeito ósseo. Aumento original 25x. HE.

Grupo tratado - 30 dias: B - Trabéculas ósseas preenchendo o defeito. Setas indicam os limites da loja cirúrgica. Aumento original 25x. HE.

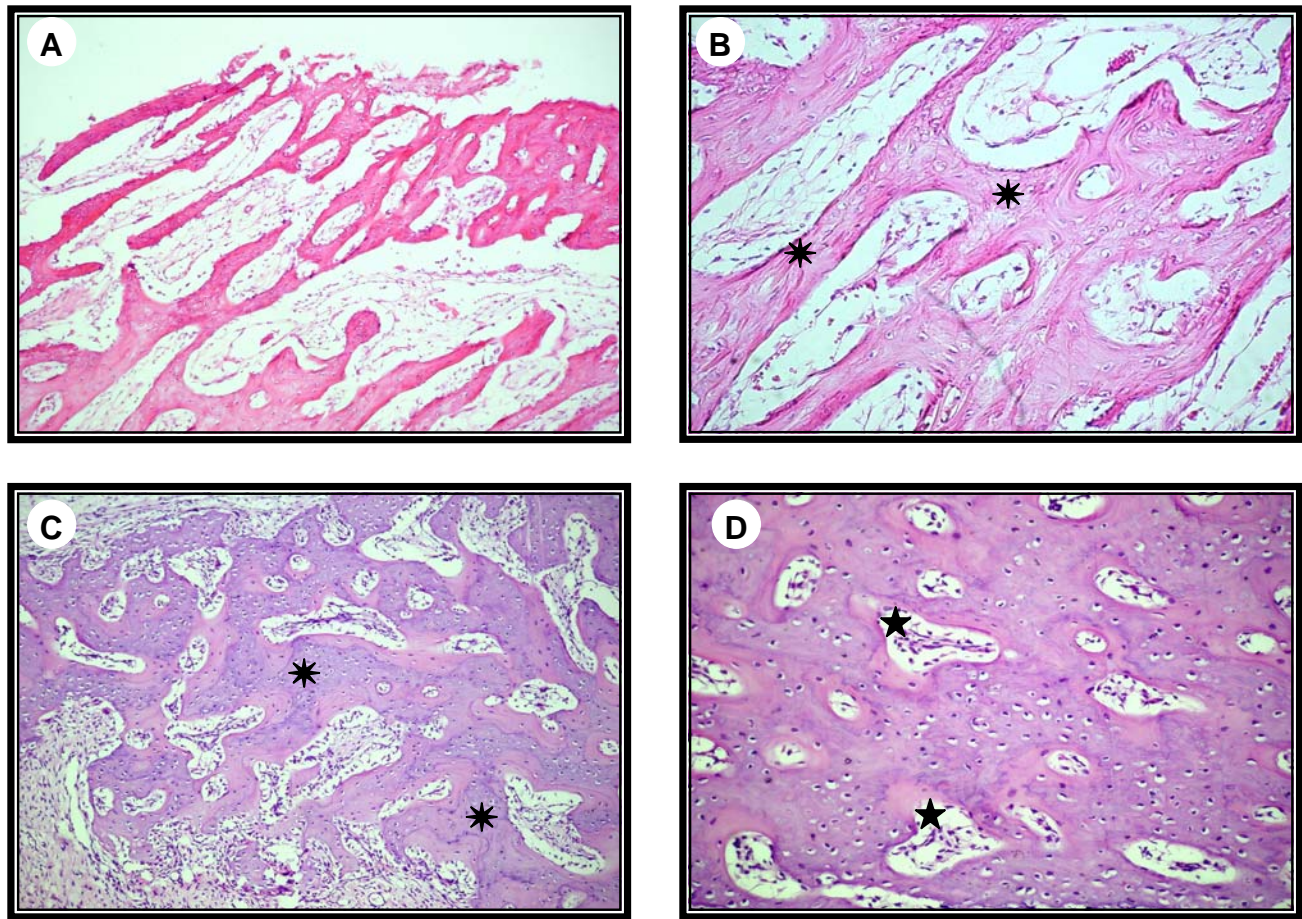


Figura 10 - Grupo controle - 30 dias: **A** - Trabéculas ósseas envolvidas por tecido conjuntivo osteogênico. Aumento original 100x. HE. **B** - Trabéculas ósseas neoformadas, imaturas, delgadas (asteriscos). Aumento original 200x. HE.

Grupo tratado - 30 dias: **C** - Trabéculas ósseas neoformadas, espessas (asteriscos) envolvidas por tecido conjuntivo osteogênico celularizado. Aumento original 100x. HE. **D** - Trabéculas ósseas celularizadas. Amplos canais vasculares (estrelas). Aumento original 200x. HE.

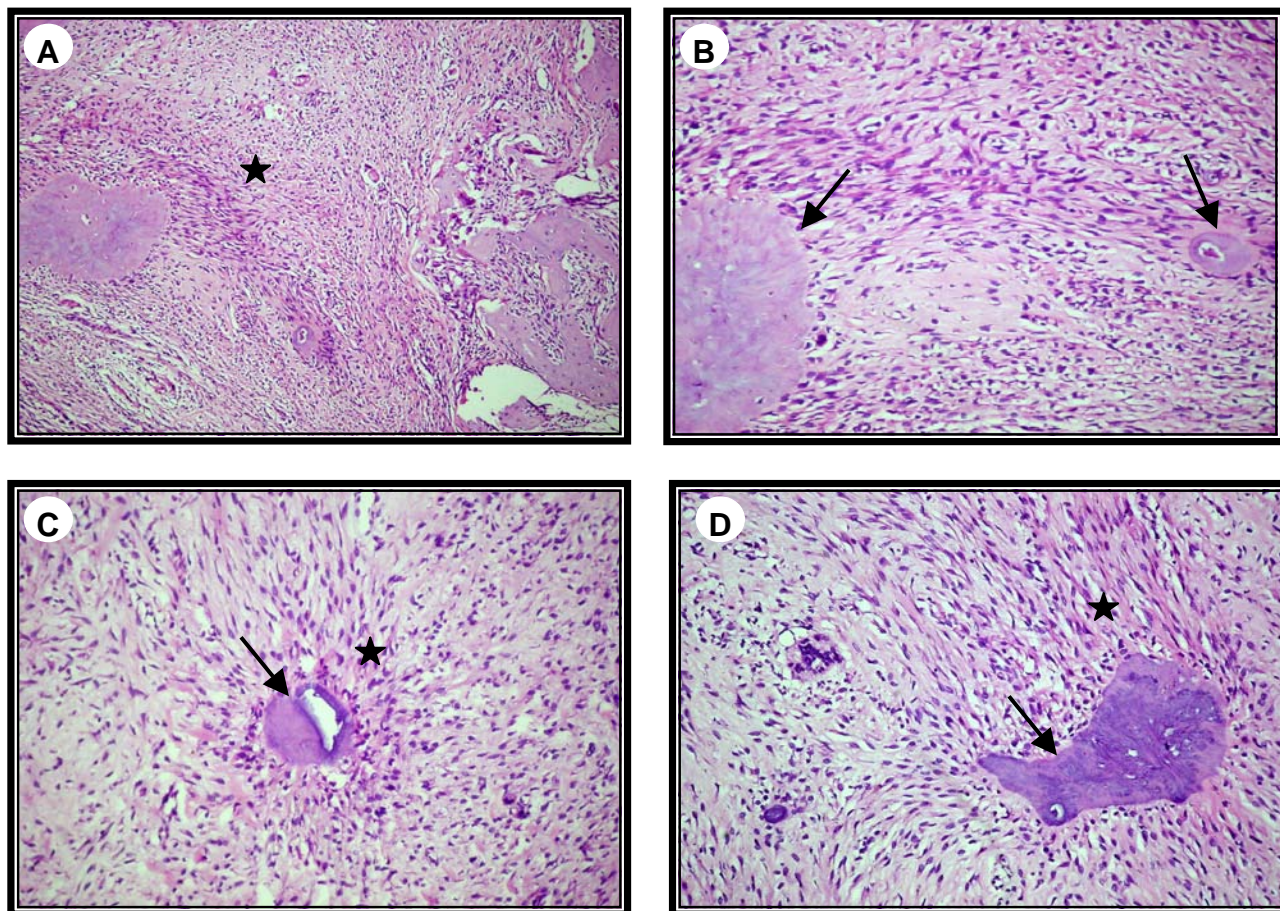


Figura 11 - Grupo tratado - 30 dias: **A** - Tecido conjuntivo osteogênico (estrela). Aumento original 100x. HE. **B** - Partículas de MDDH-L em diferentes graus de desintegração (setas). Aumento original 200x. HE. **C** - Partícula de MDDH-L (seta). Acúmulo de células osteogênicas ativas circundando a partícula (estrela). Aumento original 200x. HE. **D** - Partícula basofílica de MDDH-L (seta). Tecido osteogênico altamente celularizado (estrela). Aumento original 200x. HE.

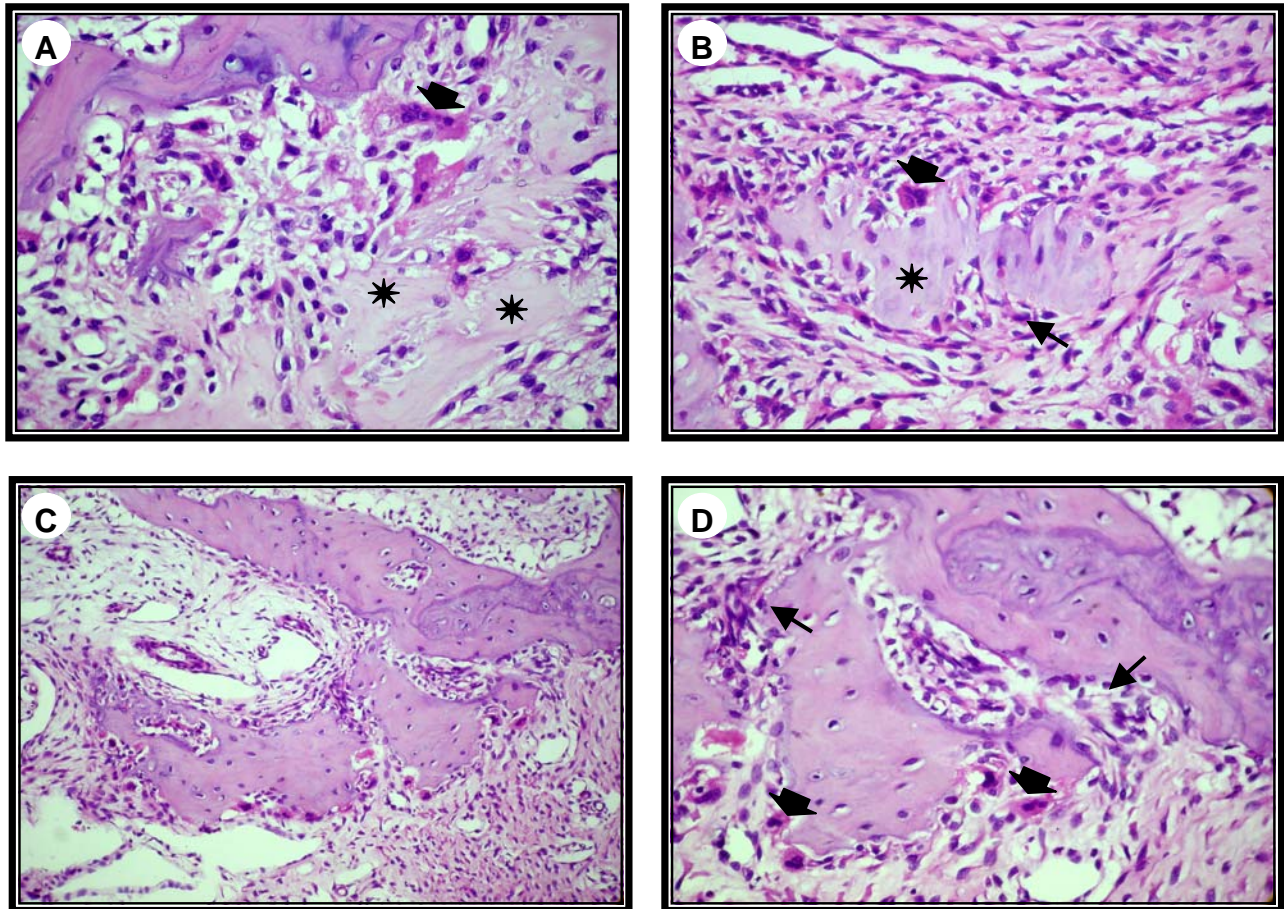


Figura 12 - Grupo tratado - 30 dias: **A** - Osteoclasto (cabeça de seta). Matriz orgânica do tecido ósseo neoformado (asteriscos). Aumento original 200x. HE. **B** - Osteoclasto (cabeça de seta). Osteoblasto (seta). Matriz osteóide (asterisco). Aumento original 200x. HE. **C** - Intensa atividade remodeladora do tecido ósseo neoformado. Aumento original 100x. HE. **D** - Osteoclastos (cabeças de setas) e osteoblastos (setas) remodelando trabéculas ósseas neoformadas. Aumento original 200x. HE.

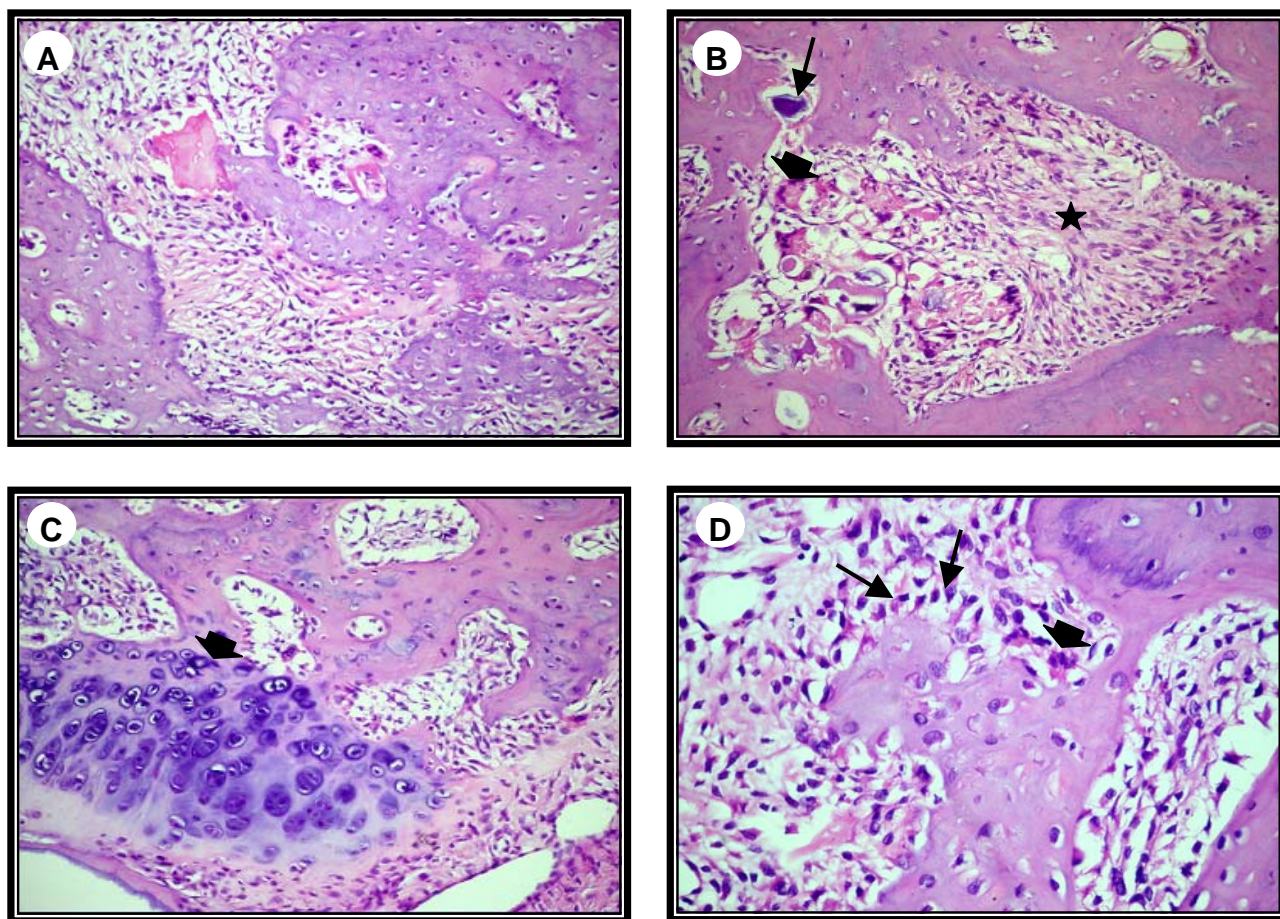


Figura 13 - Grupo tratado - 30 dias: **A** - Atividade osteogênica acentuada. Trabéculas ósseas neoformadas e celularizadas. Aumento original 100x. HE. **B** - Partícula de MDDH-L incorporada ao tecido ósseo (seta). Tecido conjuntivo osteogênico (estrela). Osteoclasto (cabeça de seta). Aumento original 200x. HE. **C** - Cartilagem hialina formada em um dos espécimes (cabeça de seta). Aumento original 200x. HE. **D** - Atividade remodeladora. Osteoclasto (cabeça de seta). Osteoblastos (setas). Aumento original 400x. HE.

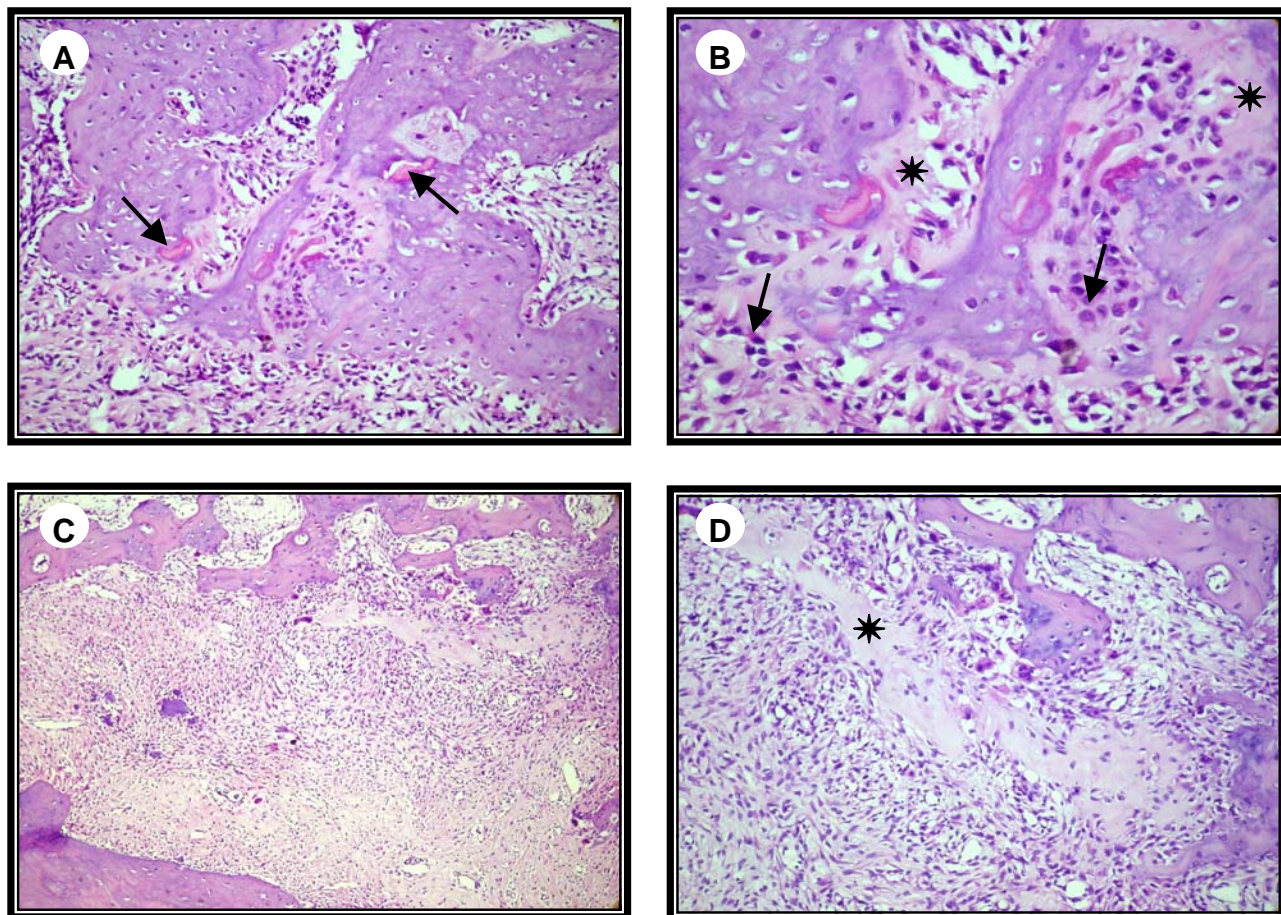


Figura 14 - Grupo tratado - 30 dias: **A** - Tecido ósseo neoformado envolto por grande quantidade de células osteogênicas. Inclusão de partículas de MDDH-L (setas). Aumento original 200x. HE. **B** - Matriz osteóide (asteriscos). Células osteogênicas ativas (setas). Aumento original 400x. HE. **C** - Atividade osteogênica expressiva. Aumento original 100x. HE. **D** - Matriz osteóide revelando intensa atividade neoformadora (asterisco). Aumento original 200x. HE.

5.2.2 PERÍODO DE 60 DIAS

No grupo **A**, a região do defeito ósseo foi uniformemente preenchida por tecido ósseo apenas na porção superficial. Na região central do defeito foram observadas trabéculas ósseas finas, delicadas e esparsas, além de grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo, apresentando este, pequena quantidade de células osteogênicas (Figuras 15A e 16A). O tecido ósseo desta região era imaturo, bastante celularizado, apresentando amplos espaços medulares (Figuras 16A e B).

No grupo **B**, a região do defeito ósseo foi quase que totalmente preenchida por trabéculas ósseas imaturas espessas (Figura 15B), bastante celularizadas, apresentando espaços medulares menores que os do grupo **A**, preenchidos por tecido conjuntivo osteogênico, também, abundantemente celularizado (Figuras 16C e D). O tecido ósseo apresentou aspecto bem mais compacto em relação ao grupo **A** (Figura 15B). Notou-se a presença de matriz osteóide em meio ao tecido ósseo já mineralizado e de significativa quantidade de osteoblastos (Figura 17B), além de expressivo número de osteoclastos permeando as trabéculas ósseas neoformadas (Figuras 17A, B, C e D).

Na maioria dos cortes foram observadas partículas de MDDH-L ainda presentes no tecido conjuntivo osteogênico ou, em menor quantidade no tecido ósseo neoformado. As partículas de matriz dentinária apresentaram-se envoltas por grande quantidade de células osteogênicas e mostravam tamanhos diversos e graus variados de reabsorção (Figuras 18A, B, C e D).

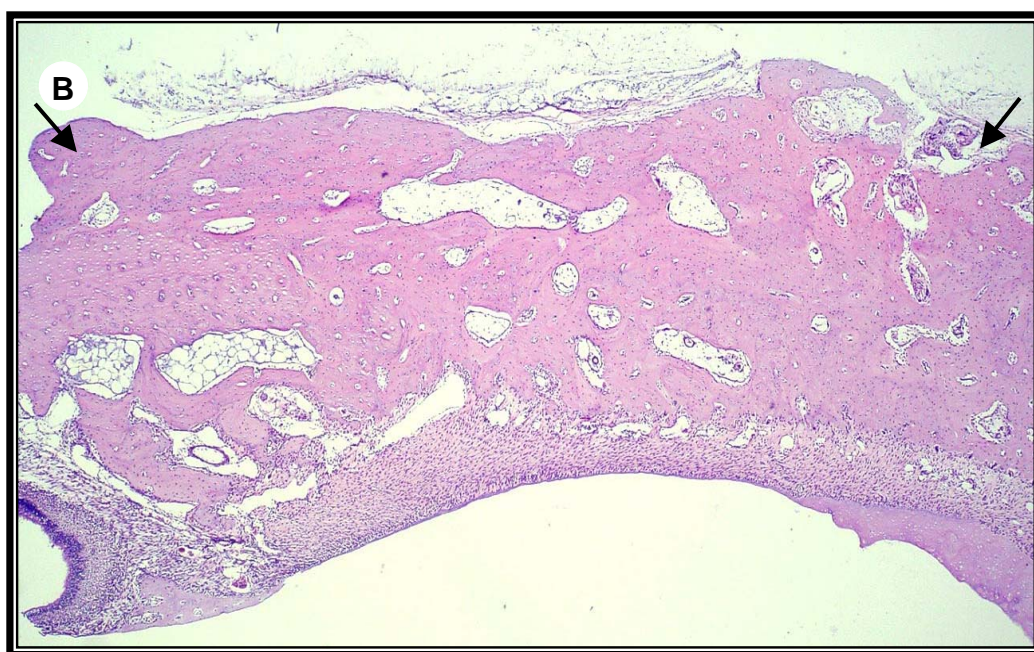
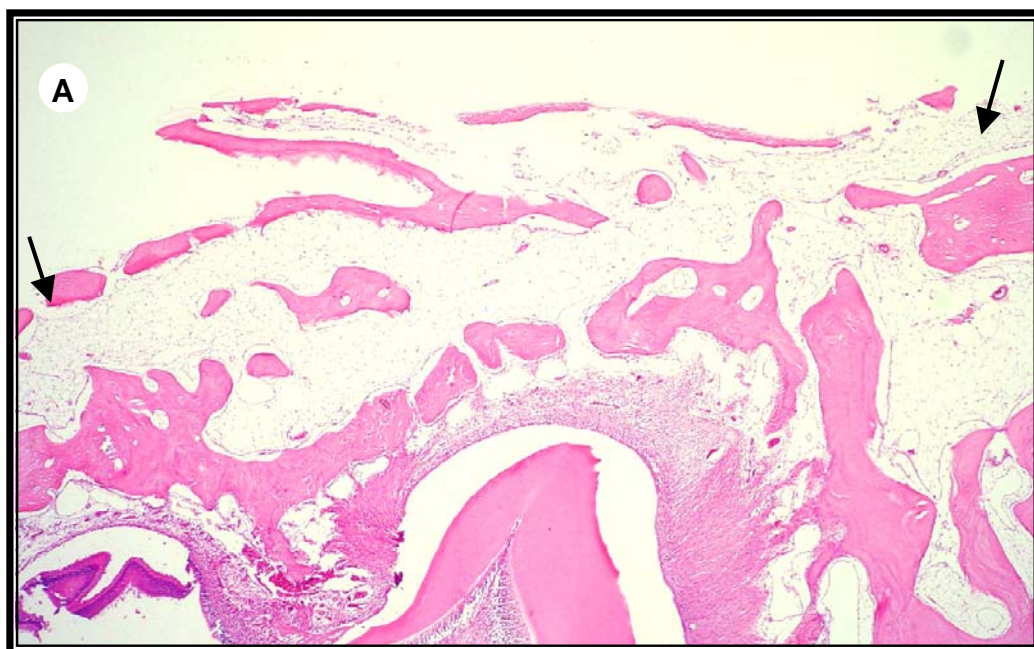


Figura 15 - Grupo controle - 60 dias: **A** - Trabeculado ósseo preenchendo parcialmente o defeito. Setas indicam os limites do defeito ósseo. Aumento original 25 X. HE.

Grupo tratado - 60 dias: **B** - Trabéculas ósseas preenchendo completamente o defeito cirúrgico. Setas indicam os limites do defeito ósseo. Aumento original 25 X. HE.

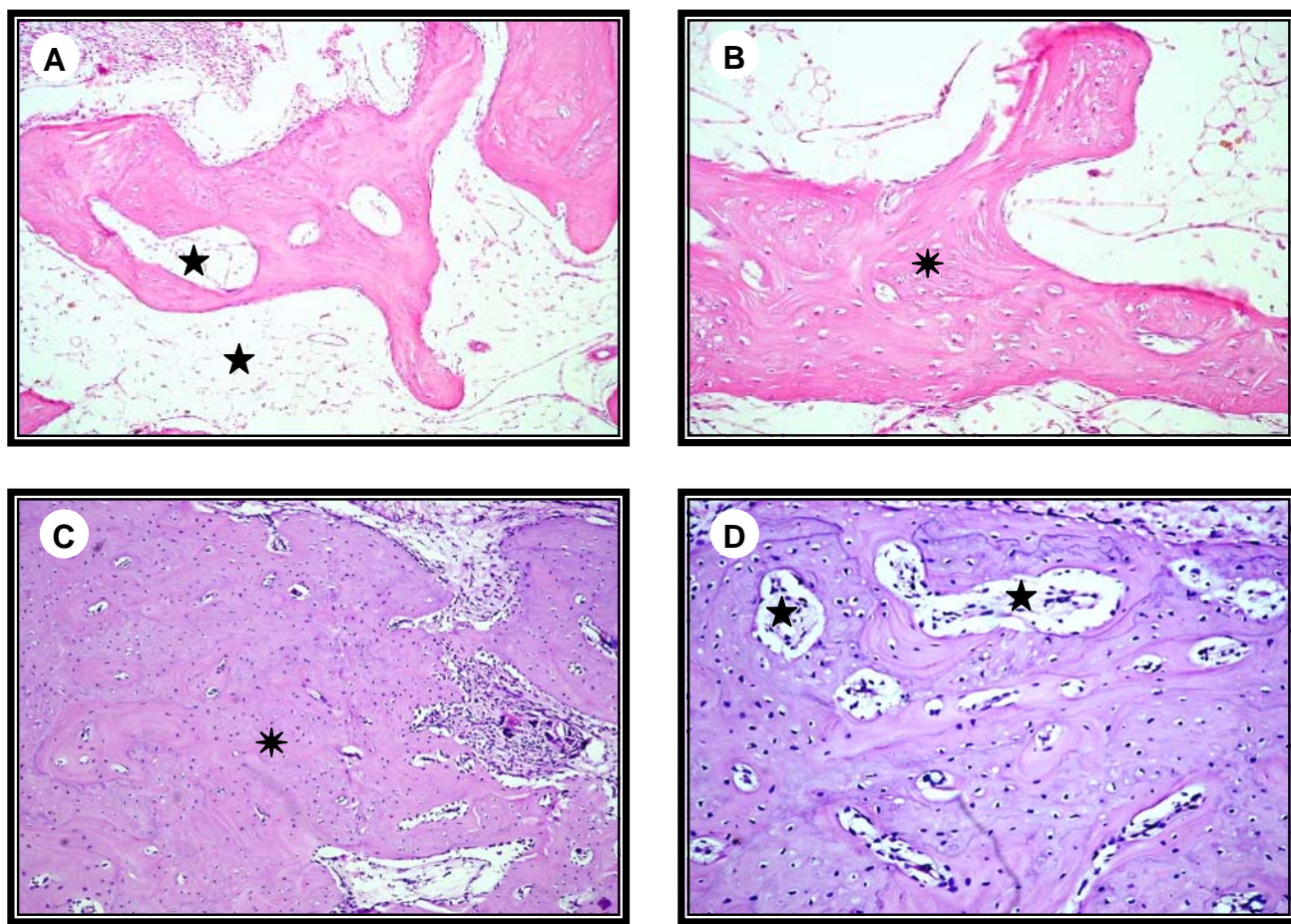


Figura 16 - Grupo controle - 60 dias: **A** - Trabéculas ósseas esparsas em meio ao tecido conjuntivo osteogênico. Espaços medulares (estrelas). Aumento original 100x. HE. **B** - Trabéculas ósseas celularizadas (asterisco). Aumento original 200x. HE.

Grupo tratado - 60 dias: **C** - Tecido ósseo neoformado, bastante celularizado (asterisco) envolvido por tecido conjuntivo osteogênico. Aumento original 100x. HE. **D** - Trabéculas ósseas celularizadas. Amplos canais vasculares (estrelas). Aumento original 200x. HE.

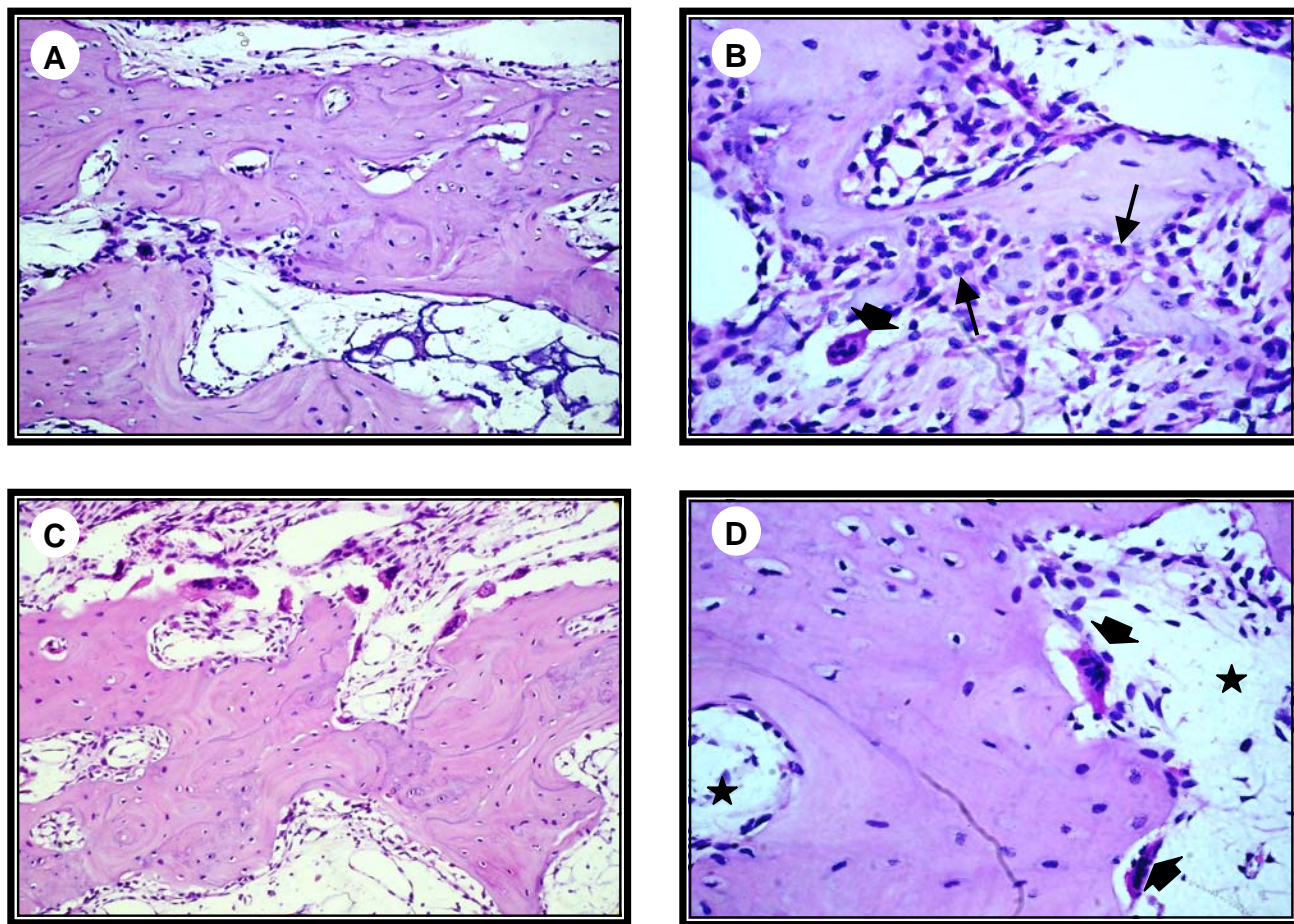


Figura 17 - Grupo tratado - 60 dias: A - Trabéculas ósseas espessas e bastante celularizadas.

Aumento original 100x. HE. **B** - Osteoclastos (cabeça de seta) e osteoblastos (setas)

evidenciando atividade osteogênica. Aumento original 200x. HE. **C** - Atividade remodeladora

intensa do tecido ósseo neoformado. Aumento original 100x. HE. **D** - Osteoclastos (cabeças

de setas) remodelando trabéculas ósseas celularizadas. Amplos espaços medulares

(estrelas). Aumento original 200x. HE.

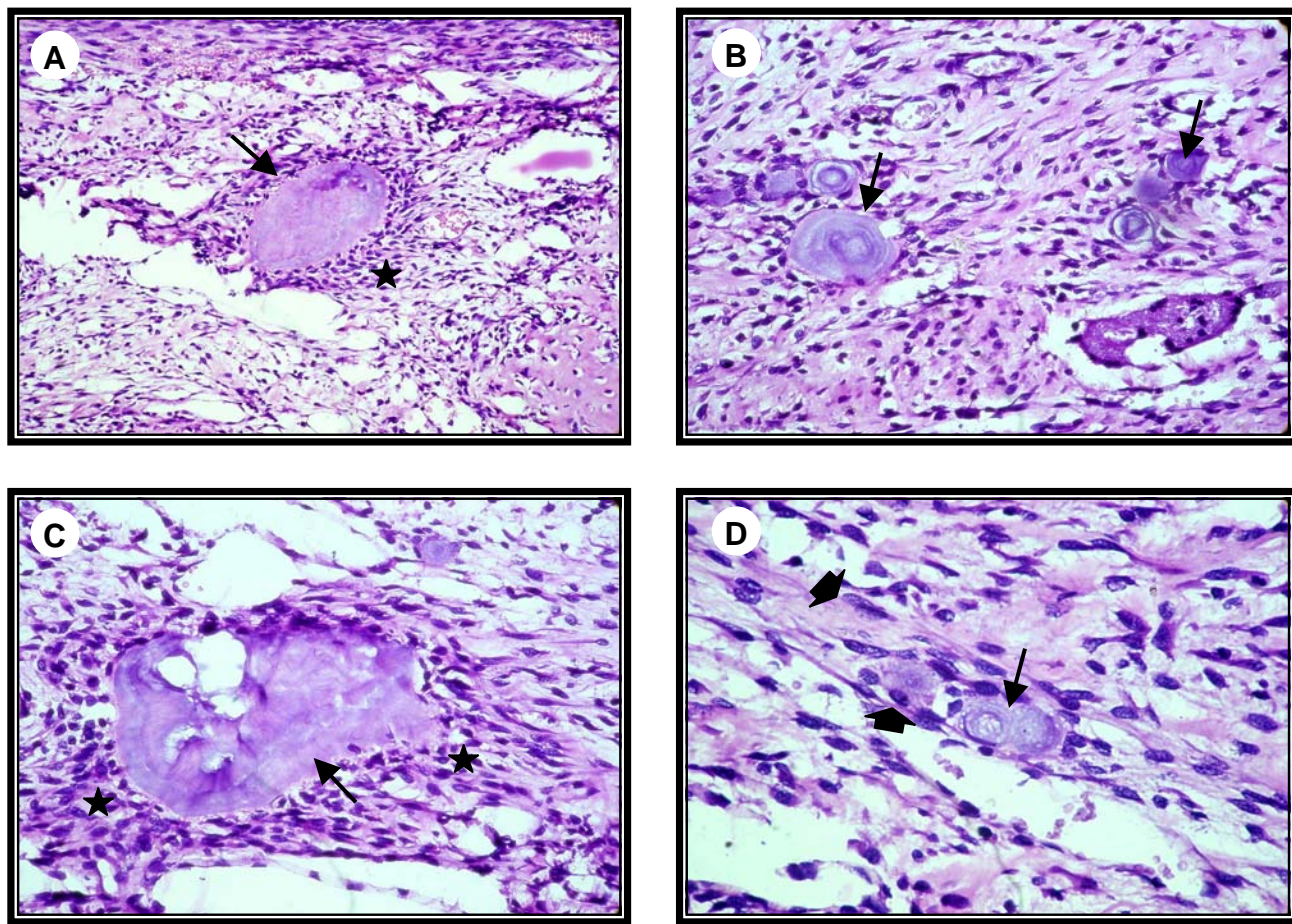


Figura 18 - Grupo tratado - 60 dias: **A** - Partícula de MDDH-L (seta) envolvida por células osteogênicas ativas (estrela). Aumento original 100x. HE. **B** - Partículas de MDDH-L (setas) em diferentes estágios de desintegração envolvidas por tecido conjuntivo osteogênico. Aumento original 200x. HE. **C** - Partícula de MDDH-L (seta). Células osteogênicas (estrelas). Aumento original 400x. HE. **D** - Partícula de MDDH-L (seta). Osteoblastos (cabeças de setas). Aumento original 400x. HE.

5.2.3 PERÍODO DE 90 DIAS

No grupo **A**, a região do defeito ósseo foi preenchida parcialmente por tecido ósseo. Recobrimdo a superfície do defeito observou-se a presença de uma lâmina contínua, revelando, porém, uma concavidade óssea na região central do defeito (Figura 19A). Amplos canais de Havers e espaços medulares também estavam evidentes, preenchidos por tecido conjuntivo pouco celularizado (Figuras 20A e B).

No grupo **B**, a região do defeito cirúrgico foi totalmente ocupada por uma faixa contínua, espessa e homogênea de tecido ósseo. A superfície do defeito apresentava uma ligeira convexidade (Figura 19B). As trabéculas ósseas mostraram avançado grau de organização tecidual com sistemas de Havers característicos distribuídos por toda a sua extensão (Figuras 20C e D e 21B e C). Não foram observadas partículas de MDDH-L incorporadas ao tecido ósseo neoformado, nem tampouco, presentes no tecido conjuntivo, como também atividade osteogênica e/ou remodeladora. (Figuras 21A, B, C e D).

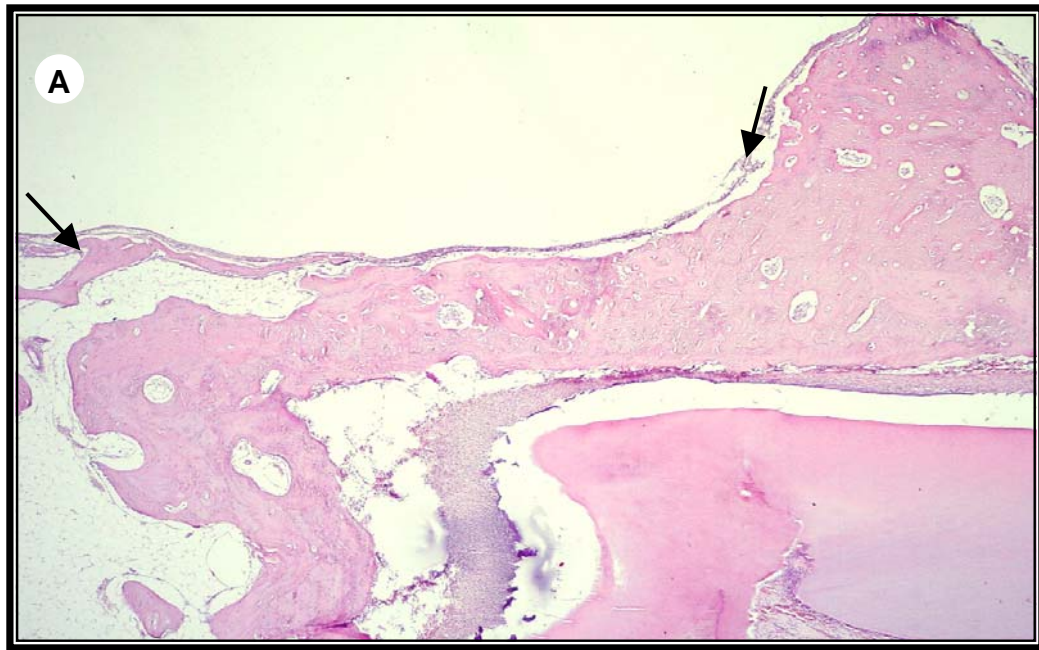


Figura 19 - Grupo controle - 90 dias: A - Tecido ósseo preenchendo parcialmente o defeito. Setas indicam os limites do defeito ósseo. Aumento original 25x. HE.

Grupo tratado - 90 dias: B - Tecido ósseo preenchendo completamente o defeito. Setas indicam os limites da loja cirúrgica. Aumento original 25x. HE.

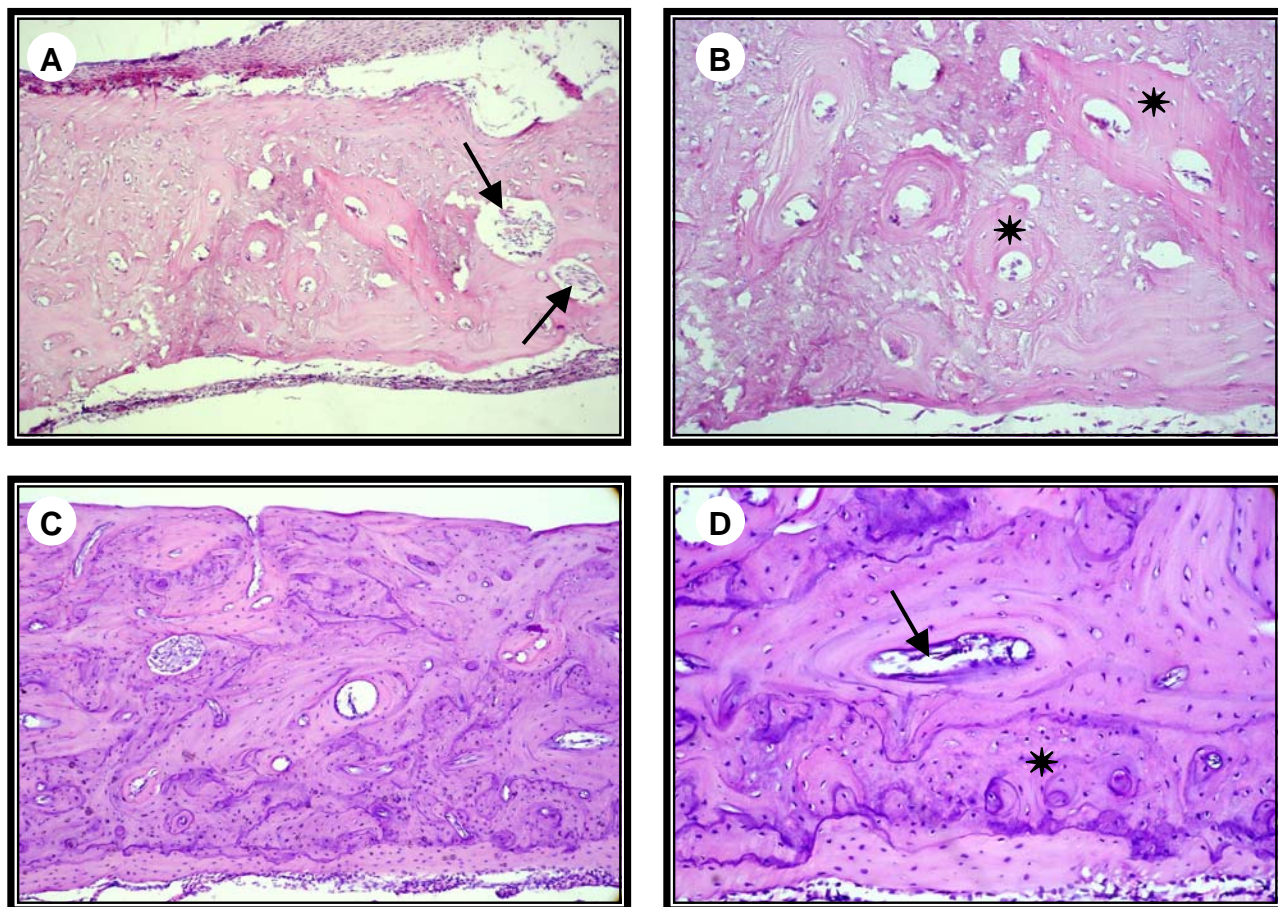


Figura 20 - Grupo controle - 90 dias: **A** - Tecido ósseo maduro com espaços medulares (setas) preenchendo a loja cirúrgica. Aumento original 100x. HE. **B** - Sistemas de Havers constituindo o tecido ósseo neoformado (asteriscos). Aumento original 200x. HE.

Grupo tratado - 90 dias: **C** - Tecido ósseo organizado preenchendo completamente a loja cirúrgica. Aumento original 100x. HE. **D** - Canal de Havers em formação (seta). Sistemas de Havers (asterisco) característicos do tecido ósseo maduro. Aumento original 200x. HE.

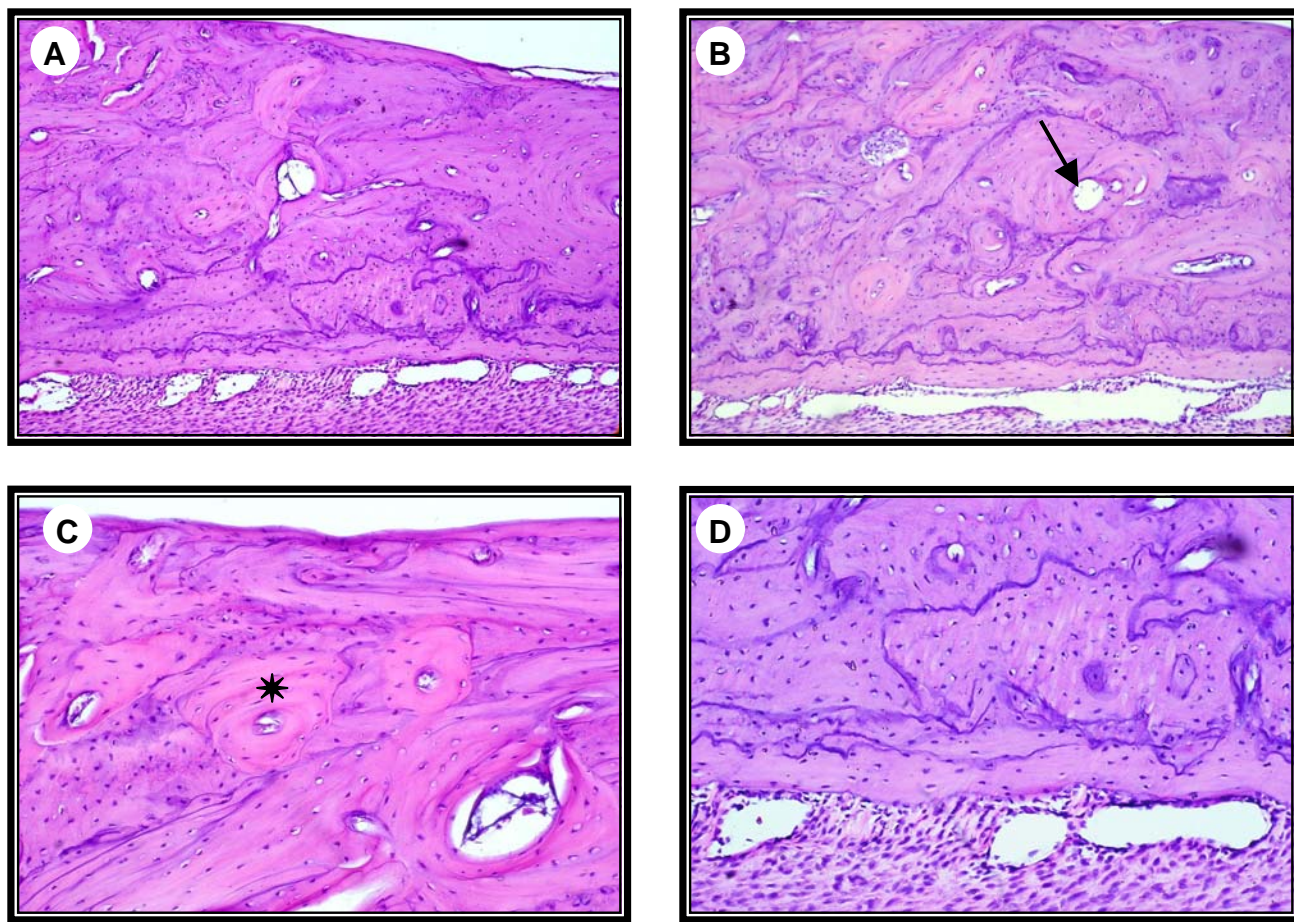


Figura 21 - Grupo tratado - 90 dias: **A** - Tecido ósseo maduro preenchendo a loja cirúrgica. Observar ausência de partículas de MDDH-L. Aumento original 100x. HE. **B** - Canal vascular (seta) do sistema de Havers em formação. Aumento original 100x. HE. **C** - Tecido ósseo organizado preenchendo a porção superficial da loja cirúrgica. Sistema de Havers (asterisco). Aumento original 200x. HE. **D** - Tecido ósseo maduro preenchendo a porção profunda da loja cirúrgica. Aumento original 200x. HE.

5.3 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

A análise histomorfométrica teve como finalidade mensurar a densidade de volume da matriz óssea neoformada nos defeitos ósseos dos grupos **A** e **B**, bem como fornecer os dados necessários à análise estatística destas medições.

As densidades de volume de matriz óssea, expressas em porcentagem, encontradas nos 27 campos microscópicos de cada animal avaliado, foram expressas na tabela 3 (Anexo 1).

De acordo com os dados, referentes à análise de variância (ANOVA), apresentados na tabela 1, houve diferença estatisticamente significativa entre as densidades de volume de matriz óssea dos grupos estudados, determinada pela probabilidade (p) encontrada de $3,53 \times 10^{-16}$, abaixo, portanto, de 5% de referência de significância.

Tabela 1

Análise de Variância (ANOVA).

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
A 30	27	8,93	0,331	0,044	0,209	63,3
A 60	27	13,69	0,507	0,051	0,226	44,6
A 90	27	11,28	0,418	0,058	0,240	57,5
B 30	36	20,82	0,578	0,019	0,138	23,9
B 60	27	17,00	0,630	0,004	0,061	9,7
B 90	27	20,32	0,753	0,006	0,079	10,5

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-p	F crítico
Entre grupos	3,1075	5	6,2151	20,95	$3,53 \times 10^{-16} **$	2,27
Resíduo	4,8960	165	0,2967			
Total	8,0035	170				

****** Significante a 5% ($p \leq 0,05$)

Após a realização da análise de variância (ANOVA), aplicou-se o Teste de Tukey, com o objetivo de calcular a diferença mínima significativa entre duas médias ao nível de 5%. Na tabela 2 foram expressos os valores das médias e

desvio padrão das densidades de volume (%) calculados para ambos os grupos analisados nos diferentes períodos de observação, além da discriminação da significância entre os grupos controle e tratado nos períodos observados.

Baseados nestes valores evidenciou-se a existência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos **A** e **B**, em relação às médias de densidade de volume de matriz óssea neoformada.

Os resultados das diferenças foram representados na forma de letras maiúsculas e minúsculas (Tabela 2). De acordo com a representação esquemática, as letras maiúsculas devem comparar, dentro de um mesmo grupo, a significância da quantidade de matriz óssea neoformada ao longo do tempo, enquanto a representação esquemática das letras minúsculas compara, dentro de um mesmo período de observação, a significância, entre os grupos, da quantidade de matriz óssea neoformada.

De acordo com a tabela 2, pôde-se constatar que no grupo **A** houve diferença significativa entre as médias de matriz óssea neoformada aos 30 e 60 dias de reparação óssea, enquanto no grupo **B**, a diferença foi significativa entre os 30 e 90 dias.

Ainda na tabela 2, de acordo com a representação esquemática de letras minúsculas, o Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) evidenciou que aos 30 dias de reparação o grupo **B** apresentou um grau de neoformação óssea maior e estatisticamente significativo em relação ao grupo **A**, ocorrendo o mesmo aos 90 dias.

Aos 60 dias de reparação óssea, o grupo **B** apresentou média de formação tecidual maior que o grupo **A**, porém, este valor não apresentou significância estatística.

Tabela 2

Médias das densidades de volume (%) de matriz óssea neoformada nos grupos controle e tratado.

Períodos de Observação	A - Controle		B - Tratado	
	Média (%)	Desvio-padrão (%)	Média (%)	Desvio-padrão (%)
30 dias	33,1	Aa	57,8	Ab
60 dias	50,7	Ba	63,0	ABa
90 dias	41,8	Aba	75,3	Bb

* Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas na vertical e minúsculas na horizontal) diferem entre si. (Vieira¹⁰⁵, 1999)

A figura 22 representa os valores das densidades de volume de matriz óssea neoformada, em porcentagem, dos grupos **A** e **B**, nos períodos de observação determinados para este estudo.

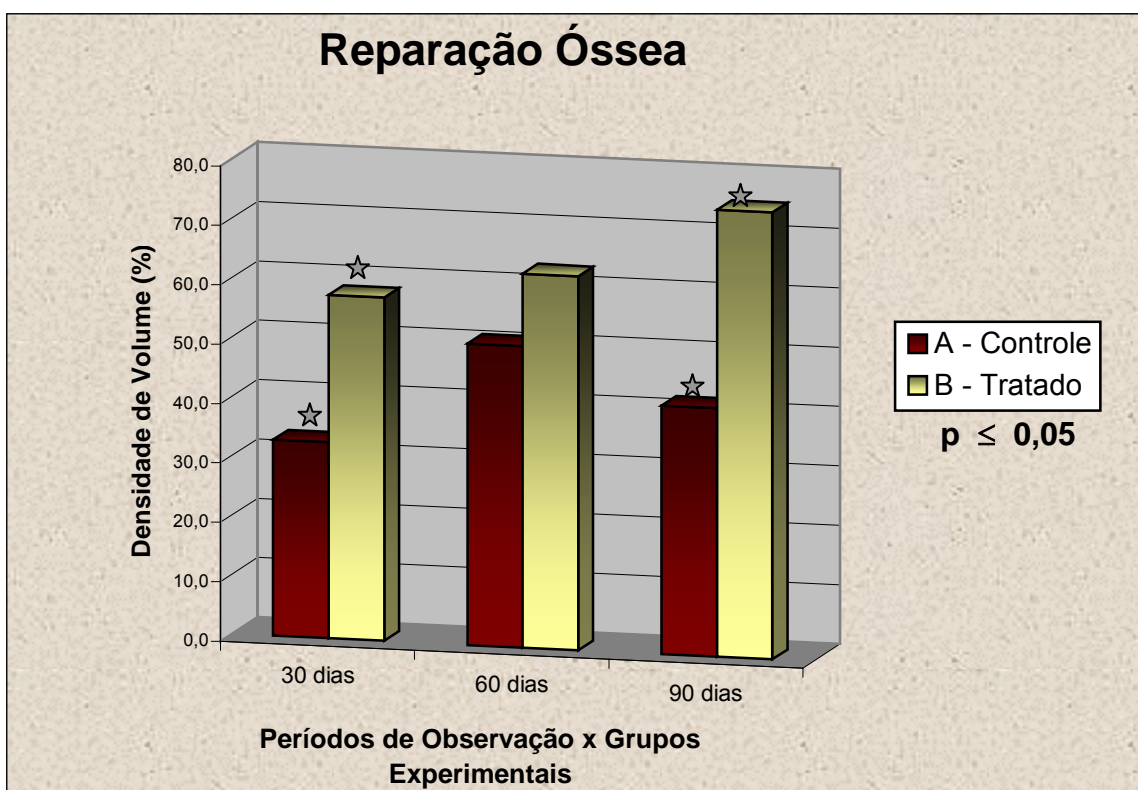


Figura 22 – Comparação das médias de densidade de volume (%) de matriz óssea neoformada nos grupos **A** e **B**.

A Figura 23 representa a evolução dos valores das densidades de volume de matriz óssea, expressos em porcentagem, dentro de cada grupo analisado, ao longo dos períodos. De acordo com o gráfico pôde-se constatar, sobretudo no grupo **B**, a uniformidade na progressão das médias da quantidade de matriz óssea neoformada no decorrer dos períodos analisados.

No grupo **A**, entretanto, esta progressão não foi uniforme, considerando a ligeira queda na média de densidade de matriz óssea neoformada aos 90 dias. Este declínio, porém, não foi estatisticamente significativo.

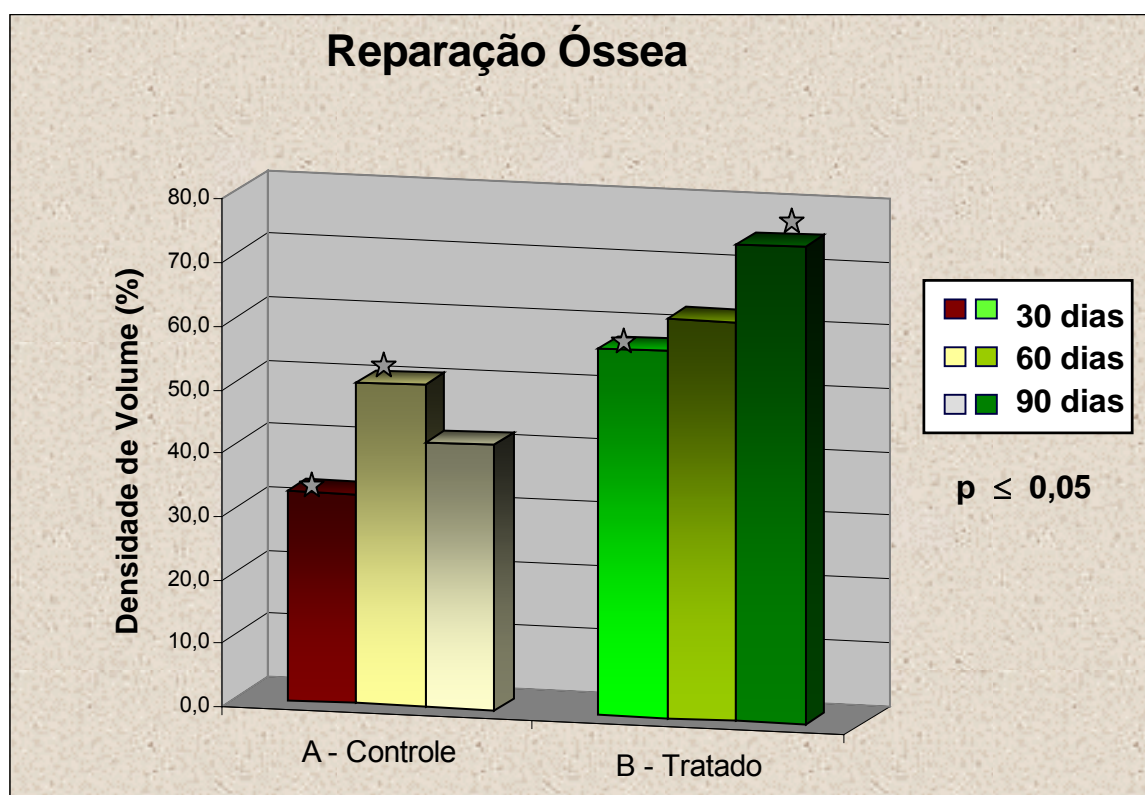


Figura 23 – Evolução das médias de densidade de volume (%) de matriz óssea neoformada nos períodos de observação dos grupos **A** e **B**.

6 DISCUSSÃO

Numerosas pesquisas têm sido relatadas na literatura, cujo objetivo primordial reside na busca de biomateriais para enxertos ósseos homogêneos que proporcionem a aceleração do processo de regeneração óssea.

Os enxertos homogêneos eliminam a necessidade de um local doador pelo próprio paciente e permitem uma maior disponibilidade em seu uso pela possibilidade de armazenamento em grandes quantidades e por longos períodos. Entretanto, ressalta-se a necessidade da biocompatibilidade que esses biomateriais homogêneos devem apresentar, para que não sejam desencadeadas reações de incompatibilidade imunológica com conseqüente rejeição do material de enxerto utilizado e prejuízo da regeneração óssea desejada.

De acordo com Urist^{101, 102} (1965, 2002), Zasacki¹¹⁰ (1991), Mellonig *et al.*⁶⁵ (1992) e Simões⁹² (1997), a liofilização consiste numa técnica de preparo adequada a biomateriais de enxertos homogêneos, uma vez que, têm-se observado a diminuição do risco de transmissão de infecções, além do significativo declínio de sua antigenicidade estimulando apenas discretamente a reação de resposta imune do paciente. O processo de liofilização a frio promove a desidratação da MDDH por mobilização das moléculas de água de solvatação que envolvem as macromoléculas protéicas. Esta dessecação ocorre por um mecanismo de queda brusca de pressão devido à formação de vácuo e diminuição acentuada da temperatura, controlada pelo aparelho liofilizador. As macromoléculas protéicas são as principais responsáveis pela resposta antigênica do hospedeiro (Helder *et al.*⁴³, 1998). A liofilização poderia provocar a hidrólise dessas macromoléculas permanecendo, entretanto, intactos os polipeptídeos que constituem segmentos protéicos de natureza colágena ou não, biologicamente ativos no processo de regeneração óssea. Tal fato poderia explicar a diminuição da antigenicidade da MDDH-L, sem perdas das características osteopromotoras.

No presente trabalho, assim como em Eitschberger²⁹ (1977), Dziedzic-Goclawska²⁸ (1991), Pinholt & Solheim⁸¹ (1994), Lundgren *et al.*^{59, 60} (1997, 1997a), Yoshida *et al.*¹⁰⁹ (1998) e Kim *et al.*⁵⁶ (2002) o enxerto ósseo homogêneo de MDDH preparado por liofilização a frio (- 40°C) mostrou-se biocompatível apresentando reação imune desprezível do hospedeiro, verificada na análise histomorfológica pela presença de infiltrado discreto e irrelevante de células inflamatórias mononucleares na região de reparação óssea (Figuras 11A, B, C e D), assim como, pela incorporação das partículas do enxerto liofilizado de MDDH ao tecido ósseo neoformado (Figura 13B, 14A e B).

A MDDH-L apresentou, ainda, a possibilidade de ser armazenada por longos períodos à temperatura ambiente sem sofrer alterações bioquímicas expressivas, pelo fato de ser liofilizada, o que segundo Smiller *et al.*⁹³ (1992) e Mellonig *et al.*⁶⁵ (1992), constitui uma das características fundamentais para biomateriais de enxertos ósseos. A característica mencionada constitui fator importante para a implantação, no futuro, de bancos de matriz dentinária desmineralizada homogênea liofilizada destinadas a enxertos ósseos craniofaciais, similares aos já existentes que realizam a estocagem exclusivamente de ossos liofilizados e/ou congelados, provenientes de cadáveres.

Ainda, segundo Smiller *et al.*⁹³ (1992), um enxerto ideal deve ser atóxico, não antigênico, sempre viável, de fabricação simples e barata, permitindo fácil manipulação e inserção tecidual, além de não apresentar risco de transmissão de infecções.

A MDDH-L preparada nesta pesquisa satisfaz os requisitos mencionados, pois a técnica de preparo utilizada para trituração em partículas, separação química entre o esmalte e a dentina, desmineralização e liofilização requerem procedimentos e aparelhos mecânicos e eletrônicos de baixa complexidade, e componentes químicos rotineiros, de baixo custo, facilmente obtidos no mercado (Figuras 3A e B), permitindo assim, o preparo da MDDH-L em grandes quantidades e viabilizando sua aplicação clínica em larga escala. Além

disso, sua apresentação em partículas liofilizadas permite facilidade no manuseio trans-operatório e na inserção óssea do material durante o procedimento cirúrgico.

Quanto aos métodos utilizados para esterilização de biomateriais de enxerto ósseo, desde 1912 vários pesquisadores têm testado, entre outros, a fervura, o congelamento, a agitação em solução anti-séptica, o calor a seco e a irradiação (Zasacki¹¹⁰, 1991; Almeida³, 1997; Eitschberger *et al.*²⁹, 1977; Akkus & Rimnac², 2001).

Almeida³, em 1997, comparou a esterilização de enxertos de ossos alogênicos por autoclave, irradiação gama na dose de 25kGy e óxido de etileno concluindo após análises histomorfológica e histomorfométrica que não houve diferença significativa entre esses métodos no que concerne às alterações estruturais e morfológicas do material de enxerto. Entretanto, Dziedzic-Goclawska *et al.*²⁸ (1991) analisaram os efeitos da esterilização por irradiação gama da matriz óssea descalcificada liofilizada e/ou congelada, constatando diminuição da propriedade osteoindutora desse biomaterial ao receber doses entre 35 e 50kGy de irradiação gama, à temperatura ambiente.

No presente estudo, a MDDH-L recebeu dose de 20kGy de irradiação gama (⁶⁰Co) à temperatura ambiente, que corresponde à dose mínima e suficiente para esterilização do material, segundo as especificações do equipamento e metodologia aplicadas. Sendo a dose de irradiação aplicada à MDDH-L (20kGy) bem menor que a utilizada por Dziedzic-Goclawska *et al.*²⁸ (1991) em seu trabalho (35 a 50kGy), pode se explicar que, por esta razão, a MDDH-L não sofreu alterações morfofuncionais significativas causadas pela irradiação gama, não sendo seu potencial biológico osteopromotor afetado por este processo. Além disso, nossos dados demonstraram que essa dose de irradiação foi suficiente para esterilizar o material de enxerto, uma vez que não houve desenvolvimento de infecção associada ao mesmo.

Atuando como fator de estresse mecânico local, estimulando o processo de reparação óssea, as dimensões das partículas do material biológico de enxerto ósseo constituem importante variável na aceleração da atividade das

células clásticas. O estímulo da atividade remodeladora é de grande importância, uma vez que representa a liberação, sob a ação dos osteoclastos, de inúmeros fatores de crescimento e proteínas morfogenéticas contidas na matriz óssea. A liberação destes fatores permite a ativação de células osteoprogenitoras, bem como a atividade colagenolítica no local de reparação permitindo, assim, a neoformação óssea (Catanzaro-Guimarães *et al.*²¹, 1986; Busch *et al.*¹³, 1996).

Baseados nestes dados, Pallensen *et al.*⁷⁸ (2002) testaram o papel de diferentes tamanhos de partículas de osso autógeno (entre 2 e 10mm³) nos estágios iniciais da reparação óssea, concluindo que as partículas menores são preferenciais, pois aceleram a remodelação e, conseqüentemente, a reparação óssea em períodos precoces deste processo. Em nosso experimento, também se constatou, pela análise histomorfológica, a estimulação do processo de neoformação e remodelação óssea, sobretudo aos 30 dias de observação, provocada pelas partículas de MDDH-L com reduzido tamanho (0,105mm de diâmetro) (Figuras 12A, B, C e D, 13A, B e D).

Hammerle *et al.*³⁹ (1998) estudando os efeitos do osso desproteínizado bovino em defeitos ósseos constataram que o material testado exibiu apenas ação osteocondutora, sendo a ausência de osteoindução atribuída à remoção da matriz orgânica do biomaterial em questão.

Relacionando, ainda, a técnica de preparo da MDDH-L, observou-se que a desmineralização das partículas de dentina contribuiu para a aceleração da reparação óssea estudada. A observação relatada pode ser explicada pelo fato de ser a matriz orgânica dentinária um reservatório de fatores indutores da proliferação celular e quimiotaxia como IGF-I e II, TGF- β e as BMPs (Bessho *et al.*⁸, 1992; Catanzaro-Guimarães²⁰, 1993).

Acredita-se que a desmineralização das partículas de dentina, neste estudo, proporcionou uma maior disponibilidade e acesso aos componentes polipeptídicos estimuladores da matriz dentinária no local de reparação óssea. Desta maneira, a ação osteopromotora da MDDH-L não se restringiu apenas à osteocondução, mas também à indução da proliferação de células osteogênicas e

quimiotaxia das mesmas, como pode ser observado nas figuras 11A, B, C e D, 14A, B, C e D e 18A, B, C e D.

A osteoindução no processo de reparação óssea tem sido descrita como um fenômeno de transformação de células mesenquimais em células osteoprogenitoras ou osteoprecursoras classificadas como osteoprecursoras ou osteogênicas determinadas e osteoprecursoras induzíveis, segundo Friedstein³¹ (1976) e Nakashima^{73, 72} (1990, 1992), sendo que estas últimas podem ser encontradas em tecidos distantes do tecido ósseo, como subcutâneo, tecido muscular esquelético, baço e fígado onde, normalmente, não produzem osso. Entretanto, em contato com um indutor adequado, como a proteína morfogenética óssea, estas células diferenciam-se em condroblastos e/ou osteoblastos resultando na produção ectópica de cartilagem e tecido ósseo imitando a ossificação endocondral (Reddi⁸⁴, 1981). Ainda segundo Gonçalves *et al.*³⁶ (2002), Urist^{101, 102} (1965, 2002) e Torres *et al.*⁹⁹ (2000), defeitos ósseos são passíveis de sofrerem instabilidade biomecânica, principalmente nas áreas centrais dos defeitos, sujeitas à ação dos músculos adjacentes. A mobilidade acima do nível fisiológico prejudica a angiogênese e a tensão de oxigênio cai, criando assim um microambiente condrogênico. Uma vez que o tecido cartilaginoso possui necessidades metabólicas reduzidas em relação ao tecido ósseo, este poderá se desenvolver em áreas sem estabilidade funcional. Sendo assim, a matriz dentinária pode induzir a formação de cartilagem em áreas heterotópicas ou quando enxertada em defeitos ósseos em áreas sujeitas à hipóxia por fatores biomecânicos.

De acordo com os estudos acima relacionados, a formação de cartilagem (Figura 13C) na porção periférica da loja óssea em um dos espécimes deste experimento pode ser justificada tanto pela ação indutora das partículas de MDDH-L estimulando a proliferação e a diferenciação de células osteoprecursoras induzíveis presentes no local de reparação óssea, em condroblastos, quanto pela hipóxia causada por instabilidade do enxerto em determinados locais sujeitos à ação da musculatura. Além disso, Hamata *et al.*³⁸ (2002) em estudo

histomorfométrico comparativo, observaram que as diferenças nas composições química e estrutural das matrizes óssea e dentinária homogêneas alteram os mecanismos de osteoindução quando enxertadas na região intramuscular de ratos, havendo a formação de cartilagem numa fase intermediária da osteogênese nos animais que receberam enxerto de matriz dentinária, sendo semelhantes, a quantidade e a qualidade final do tecido ósseo neoformado.

O processo de reparação óssea envolve, segundo Junqueira *et al.*⁵² (2002), migração de células mesenquimais, proliferação e diferenciação de células osteogênicas. Segundo Catanzaro-Guimarães²⁰ (1993), Canalis¹⁶ (1983), Martin⁶³ (1994) todo o processo de osteoindução é controlado por complexas interações moleculares que influenciam quimiotaxia, proliferação, diferenciação das células de linhagens osteoblástica e osteoclástica.

A matriz orgânica dentinária além da indução da proliferação e diferenciação osteoblásticas possui propriedades quimiotáticas (Catanzaro-Guimarães²⁰, 1993; Gomes *et al.*^{35, 34}, 2001, 2002; Carvalho¹⁹, 2001; Gomes *et al.*³³, 2002). Fatores estimuladores locais, presentes na matriz dentinária, como as BMPs, iniciam a proliferação celular no processo de reparação óssea (Urist & Strates¹⁰³, 1971) podendo, também, proteínas estruturais como os colágenos participarem deste processo (Mundy⁶⁷, 1994).

Por conseguinte, a observação, neste trabalho, das figuras 13A, B, C e D, também revelam, de acordo com os autores acima citados, a grande quantidade de células do tecido conjuntivo osteogênico que se formou no local de reparação óssea. Esta proliferação celular, provavelmente, é decorrente da liberação de fatores indutores da multiplicação celular durante o processo de reabsorção da MDDH-L. Além da proliferação evidente de células osteogênicas, pôde-se constatar, sobretudo, que grande número dessas células envolvia de forma acentuada as partículas de MDDH-L, demonstrando a indiscutível capacidade quimiotática deste material de enxerto liofilizado (Figuras 11A, B, C e D, 18A, B, C e D), levando a crer que a atividade estimulante, por parte da MDDH-L, provoque a diferenciação de células indiferenciadas em células osteogênicas, a

despeito do fato de não terem sido realizadas análises que permitissem o reconhecimento das células da linhagem osteogênica no local de reparação óssea. No entanto, análises futuras para evidênciação imunocitoquímica de componentes que revelem o fenótipo de células osteoblásticas, como a expressão da atividade da fosfatase alcalina, osteocalcina, osteonectina, sialoproteína óssea e/ou BMPs (Massague⁶⁴, 1985; Jin & Yang⁵¹, 1990; Schmitz *et al.*⁹¹, 1990; Ishidou *et al.*⁴⁹, 1995), entre outras, tornam-se importantes para a caracterização da atividade osteoindutora da MDDH-L

Alguns autores acreditam, ainda, que a função do enxerto de matriz óssea desmineralizada, seja de induzir a neovascularização no interior do defeito, enquanto que as células mesenquimais indiferenciadas da região perivascular dos novos vasos sangüíneos, seriam induzidas a se diferenciarem em osteoblastos pelas proteínas morfogenéticas da matriz óssea desmineralizada (Bessho *et al.*^{9, 8}, 1990, 1992). No presente estudo as observações a respeito da neovascularização no interior do defeito ficaram evidentes no período de 30 e 60 dias de observação no grupo tratado, onde o tecido ósseo neoformado apresentou amplos canais vasculares permeando suas trabéculas, caracterizando intensa vascularização na região de reparação (Figuras 9B, 10C e D, 15B, 16C e D).

A ocorrência de grande quantidade de células osteogênicas localizadas sobre as partículas de MDDH-L, nos períodos de 30 e 60 dias no grupo tratado, vem confirmar os resultados de Nakashima⁷³ (1990), Catanzaro-Guimarães²¹ (1986), Gomes *et al.*^{35, 34} (2001, 2002) e Carvalho¹⁹ (2001) que analisaram matriz dentinária desmineralizada sob as formas de partículas e/ou fatias, sugerindo que a matriz dentinária enxertada, poderia promover uma superfície adequada para fixação das células mesenquimais indiferenciadas, auxiliando na orientação celular, caracterizando sua ação osteocondutora. Estes autores descreveram a atividade osteocondutora da matriz dentinária em fatias, porém, alguns deles constataram osteocondução também com emprego de dentina particulada. Este fato deve-se, provavelmente, à maior superfície de contato oferecida pelas

numerosas partículas de MDDH-L com o tecido osteogênico da região, fornecendo substrato favorável à deposição de matriz óssea.

Os reparos ósseos decorrente de lesões, fraturas e defeitos são ativados pela liberação de fatores de crescimento, como as BMPs abundantes na matriz óssea e produzidas por osteoblastos (Helder *et al.*⁴³, 1998). Entretanto, autores como Lundgren *et al.*^{59, 60} (1997, 1997a), Hammerle *et al.*^{40, 39} (1997, 1998) e Caplanis *et al.*¹⁷ (1998), relatam a osteocondução inicial, no processo de reparação óssea, de biomateriais de enxertos particulados e liofilizados. Essa ação osteocondutora aceleraria, inicialmente, a neoformação óssea provocada pelo aumento do recrutamento de células osteoprogenitoras. Segundo Simões⁹² (1997), a atividade inicial de condução da regeneração óssea levaria à aceleração do processo de remodelação no local, com conseqüente liberação de fatores de crescimento e proteínas morfogenéticas. Acredita-se que esta mesma seqüência de fenômenos ocorra no enxerto liofilizado de MDDH no processo de regeneração óssea, pois a capacidade de osteocondução e de osteoindução da matriz dentinária foi constatada em inúmeros trabalhos relacionados na literatura como os de: Butler *et al.*¹⁵ (1977), Alper *et al.*⁴ (1989), Bessho *et al.*⁸ (1992) Buser *et al.*¹⁴ (1994), Tziafas *et al.*¹⁰⁰ (1995), Yoshida *et al.*¹⁰⁹ (1998), Okamoto *et al.*⁷⁷ (1999), Cheng *et al.*²³ (2001), Hamata *et al.*³⁸ (2002), Kim *et al.*⁵⁶ (2002), entre outros.

Ainda neste contexto, Alper *et al.*⁴ (1989), Rabie *et al.*⁸² (1996) e Lundgren *et al.*⁵⁹ (1997) afirmaram que os enxertos ósseos podem agir como barreira física, prevenindo o crescimento do tecido conjuntivo para o interior do defeito e favorecendo, desta maneira, a reparação óssea por células específicas osteogênicas.

Os resultados das análises macroscópica e microscópica dos grupos estudados mostraram que no grupo tratado, houve o completo preenchimento das lojas cirúrgicas por tecido ósseo neoformado em todos os períodos de observação após o enxerto, o que vai ao encontro dos trabalhos de vários autores que usaram a matriz dentinária (Carvalho¹⁹, 2001; Gomes *et al.*^{35, 34}, 2001, 2002). Pesquisadores que utilizaram a gelatina de MDDH testando defeitos ósseos de

tamanho crítico no osso parietal de ratos, evidenciaram regeneração completa, comprovando a alta eficiência osteoformadora da dentina (Gould *et al.*³⁷, 1982).

Considerando as propriedades osteopromotoras da MDDH-L anteriormente discutidas, deve-se ressaltar a significância estatística no aumento da neoformação óssea no grupo tratado em relação ao grupo controle, sobretudo aos 30 e 90 dias de observação (Figura 22). Observou-se, no grupo tratado, uniformidade e constante aumento da quantidade de matriz óssea neoformada ao longo do tempo (Figura 23). Este fato poderia estar relacionado à estimulação da proliferação e da atividade de células osteoblásticas e clásticas pelas partículas de MDDH-L na região do reparo, resultando na extensão deste processo de regeneração até 90 dias. Por outro lado, no grupo controle observou-se a heterogeneidade do processo com o decréscimo, apesar de estatisticamente não significativo, do volume de neoformação óssea de 60 para 90 dias. Isto poderia ser decorrente de uma compactação e organização da cortical óssea aos 90 dias, resultante do processo de maturação do tecido formado, traduzindo uma diminuição do volume final do osso e talvez indicando a presença de menor quantidade de fatores estimuladores locais.

Além da superioridade quantitativa de tecido ósseo neoformado no grupo tratado, é importante e notória a superioridade qualitativa do osso neoformado no mesmo grupo, quando comparado ao grupo controle. A melhor qualidade estrutural óssea no grupo tratado revela-se no maior grau de organização deste tecido, além de apresentar trabeculado espesso e numeroso com distribuição regular e uniforme tanto na extensão quanto na profundidade da loja cirúrgica (Figuras 9B, 10C, 15B, 16C, 19B, 20C e 21A).

Muitos parâmetros para os variados estudos sobre os materiais biológicos osteoindutores têm sido considerados. Dentre eles, a biocompatibilidade, estocagem sem perda da viabilidade, facilidade de obtenção do material e relação custo/benefício, importantes requisitos a serem preenchidos por materiais biológicos osteoindutores testados atualmente (Yeomans & Urist¹⁰⁸,

1967; Bang⁶, 1972; Knudsen *et al.*⁵⁷, 1974; Strates *et al.*⁹⁵, 1988; Veis *et al.*¹⁰⁴, 1989; Nade⁶⁹, 1994).

Considerando as características acima mencionadas, verificamos propriedades relevantes do emprego da matriz dentinária desmineralizada homogênea liofilizada neste estudo, uma vez que se evidenciou significativo potencial osteopromotor, preenchendo plenamente os requisitos acima descritos. Essas características favoráveis contribuem para a indicação da MDDH-L como material de enxerto em feridas ósseas, com resultados extremamente positivos e grandes perspectivas de sucesso em sua aplicação nas mais variadas áreas das ciências biomédicas e, sobretudo na Odontologia.

Futuras pesquisas, com metodologia específica para a identificação das substâncias ativadoras do processo de osteoindução da MDDH-L, poderão complementar os resultados obtidos neste experimento visando o esclarecimento necessário das diversas etapas envolvidas na atividade indutora do enxerto homogêneo de matriz dentinária desmineralizada liofilizada.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e dentro das condições experimentais desta pesquisa, pode-se concluir que:

- 1- A técnica desenvolvida no preparo da MDDH-L mostrou-se adequada para a manutenção das características estruturais de seus componentes bioativos.
- 2- O processo de liofilização da MDDH proporcionou facilidade de manuseio e de implantação, além de ter permitido o armazenamento por seis meses.
- 3- O enxerto de MDDH-L mostrou-se biocompatível.
- 4- A MDDH-L estimulou de forma significativa a proliferação de células osteogênicas, evidenciando sua ação osteopromotora no processo de regeneração óssea.
- 5- O uso da MDDH-L promoveu a neoformação óssea de maneira mais rápida e em maior volume no grupo tratado, em todos os períodos observados e estatisticamente significativo aos 30 e 90 dias.
- 6- O tecido ósseo neoformado no grupo tratado apresentou, além da superioridade quantitativa, notória superioridade qualitativa quando comparado ao grupo controle.

REFERÊNCIAS*

1. Abreu PP. **Efeitos da matriz dentinária desmineralizada autógena no alvéolo dentário cruento, tratado pela técnica de regeneração óssea guiada, em humanos** [Relatório referente à Bolsa de Iniciação científica da FAPESP, 02/03952-8]. São José dos Campos: UNESP; 2003. 54p.
2. Akkus O, Rimnac CM. Fracture resistance of gamma radiationsterilized cortical bone allografts. **J Orthop Res**. 2001 Sep; 19(5): 927-34.
3. Almeida OM. **Análise histomorfométrica e estudo comparativo empregando-se aloenxertos ósseos liofilizados e esterelizados por autoclave, irradiação gama e óxido de etileno: estudo experimental** [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1997.
4. Alper G, Bernick S, Yazdi M, Nimni ME. Osteogenesis in bone defects in rats: the effects of hydroxyapatite and demineralized bone matrix. **Am J Med Sci**. 1989 Dec; 298(6): 371-6.
5. Asgar K. Chemical analysis of human teeth. **J Dent Res**. 1956 Oct; 35(5): 742-8.
6. Bang G. Induction of heterotopic bone formation by demineralized dentin in guinea pigs: antigenicity of the dentin matrix. **J Oral Pathol**. 1972; 1(4): 172-85.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviaturas dos periódicos em conformidade com o Medline.

7. Becker W, Lynch SE, Lekholm U, Becker BE, Caffesse R, Donath K, *et al.* A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. **J Periodontol.** 1992 Nov; 63(11): 929-40.

8. Bessho K, Tagawa T, Murata M. Comparison of bone matrix-derived bone morphogenetic proteins from various animals. **J Oral Maxillofac Surg.** 1992 May; 50(5): 496-501.

9. Bessho K, Tagawa T, Murata M. Purification of rabbit bone morphogenetic protein derived from bone, dentin, and wound tissue after tooth extraction. **J Oral Maxillofac Surg.** 1990 Feb; 48(2): 162-9.

10. Bostrom MP, Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. **Clin Orthop.** 1998 Oct; (355 Suppl): S116-23.

11. Brownell AG. Osteogenesis inhibitory protein: a (p)review. **Connect Tissue Res.** 1990; 24(1): 13-6.

12. Bruder SP, Fink DJ, Caplan A. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. **J Cell Biochem.** 1994 Nov; 56(3): 283-94.

13. Busch O, Solheim E, Bang G, Tornes K. Guided tissue regeneration and local delivery of insulinlike growth factor I by bioerodible polyorthoester membranes in rat calvarial defects. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 1996 Jul-Aug; 11(4): 498-505.

14. Buser D, Dahlin C, Schenk RK. **Guided bone regeneration in implant dentistry.** Chicago: Quintessence Books; c1994.

15. Butler WT, Mikulski A, Urist MR, Bridges G, Uyeno S. Noncollagenous proteins of a rat dentin matrix possessing bone morphogenetic activity. **J Dent Res.** 1977 Mar; 56(3): 228-32.
16. Canalis E. The hormonal and local regulation of bone formation. **Endocr Rev.** 1983 Winter; 4(1): 62-77.
17. Caplanis N, Lee MB, Zimmerman GJ, Selvig KA, Wikesjo UM. Effect of allogeneic freeze-dried demineralized bone matrix on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment in dogs. **J Clin Periodontol.** 1998 Oct; 25(10): 801-6.
18. Carvalho PSP, Garcia IR Jr, Consolaro A, Okamoto T. Estudo experimental sobre a matriz natural de osso esponjoso em cavidades ósseas. **Innovations.** jan. 1998; 2(1):13-20.
19. Carvalho VAP. **Efeitos da matriz dentinária desmineralizada homogênea sobre a reparação óssea em mandíbulas de coelhos – análise histomorfométrica** [dissertação]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas; 2001.
20. Catanzaro-Guimarães SA. Possibility to reinforce bone repair with decalcified dentin matrix. In: **Jahrbuch Für Orale Implatologie.** Berlim: Quintessenz Verlags-GmbH; 1993. p.33-4.
21. Catanzaro-Guimaraes SA, Catanzaro Guimaraes BP, Garcia RB, Alle N. Osteogenic potential of autogenic demineralized dentin implanted in bony defects in dogs. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 1986 Apr; 15(2): 160-9.
22. Chen PS, Toribara TY, Warner HJ. Microdetermination of phosphorus. **Analyt Chem.** 1956; 28: 1758.

23. Cheng K, Zhu Z, Tang W, Tang X. Decalcificated human dentin matrix in autogenous repair of skull defects. **Chin J Traumatol**. 2001 Nov; 4(4): 248-50.
24. Chiapasco M, Abati S, Romeo E, Vogel G. Clinical outcome of autogenous bone blocks or guided bone regeneration with e-PTFE membranes for the reconstruction of narrow edentulous ridges. **Clin Oral Implants Res**. 1999 Aug; 10(4): 278-88.
25. Cho KS, Choi SH, Han KH, Chai JK, Wikesjo UM, Kim CK. Alveolar bone formation at dental implant dehiscence defects following guided bone regeneration and xenogeneic freeze-dried demineralized bone matrix. **Clin Oral Implants Res**. 1998 Dec; 9(6): 419-28.
26. Cormack DH. Osso. In: Ham AW. **Ham histologia**. 9.ed. Rio de Janeiro: Lippincott, c1991. p.216-54.
27. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. **Plast Reconstr Surg**. 1988 May; 81(5): 672-6.
28. Dziedzic-Goclawska A, Ostrowski K, Stachowicz W, Michalik J, Grzesik W. Effect of radiation sterilization on the osteoinductive properties and the rate of remodeling of bone implants preserved by lyophilization and deep-freezing. **Clin Orthop**. 1991 Nov; (272): 30-7.
29. Eitschberger E, Heine WD, Gammert C, Richter W. The implantation of lyophilized and gamma-sterilized allogenic incus and of lyophilized and gamma-sterilized xenogenetic malleus (calf) in rabbits and humans. **Arch Otorhinolaryngol**. 1977 Jun 30; 217(1): 33-40.

30. Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Trabecular bone remodeling and balance in primary hyperparathyroidism. **Bone**. 1986; 7(3): 213-21.
31. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. **Int Rev Cytol**. 1976; 47: 327-59.
32. Gao YH, Yang LJ, Yamaguchi A. Immunohistochemical demonstration of bone morphogenetic protein in odontogenic tumors. **J Oral Pathol Med**. 1997 Jul; 26(6): 273-7.
33. Gomes MAM, Alves GD, Cruz SCC, Alves JB. Avaliação do comportamento biológico da matriz orgânica dentinária humana na reparação de alvéolos dentários em ratos. In: **Anais da 19ª Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica**; 2002. Águas de Lindóia: SBPqO; 2002. [Resumo Ia010].
34. Gomes MF, dos Anjos MJ, Nogueira Tde O, Catanzaro Guimaraes SA. Autogenous demineralized dentin matrix for tissue engineering applications: radiographic and histomorphometric studies. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 2002 Jul-Aug; 17(4): 488-97.
35. Gomes MF, dos Anjos MJ, Nogueira TO, Guimaraes SA. Histologic evaluation of the osteoinductive property of autogenous demineralized dentin matrix on surgical bone defects in rabbit skulls using human amniotic membrane for guided bone regeneration. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 2001 Jul-Aug; 16(4): 563-71.
36. Gonçalves EAL, Pavan AJ, Tavano O, Catanzaro-Guimarães SA. Atividade morfogenética da matriz dentinária desmineralizada: estudo em cães. **Rev Fac Odontol Bauru**. 2002; 10(1):51-56.

37. Gould TR, Westbury L, Tillman J. Dentin matrix gelatin (DMG) as a possible "universal" grafting material in periodontics. **J Periodontol.** 1982 Jan; 53(1): 22-5.
38. Hamata MM, Yunomae A, Cestari TM, Taga R. Avaliação morfométrica comparativa da capacidade osteoindutora na matriz óssea e dentinária alogênica. In: **Anais da 19ª Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica**; 2002. Águas de Lindóia: SBPqO; 2002. [Resumo Ib053].
39. Hammerle CH, Chiantella GC, Karring T, Lang NP. The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants. **Clin Oral Implants Res.** 1998 Jun; 9(3): 151-62.
40. Hammerle CH, Olah AJ, Schmid J, Fluckiger L, Gogolewski S, Winkler JR, *et al.* The biological effect of natural bone mineral on bone neoformation on the rabbit skull. **Clin Oral Implants Res.** 1997 Jun; 8(3): 198-207
41. Hammerle CH, Schmid J, Lang NP, Olah AJ. Temporal dynamics of healing in rabbit cranial defects using guided bone regeneration. **J Oral Maxillofac Surg.** 1995 Feb; 53(2): 167-74.
42. Hammerle CH, Schmid J, Olah AJ, Lang NP. Osseous healing of experimentally created defects in the calvaria of rabbits using guided bone regeneration. A pilot study. **Clin Oral Implants Res.** 1992 Sep; 3(3): 144-7.
43. Helder MN, Karg H, Bervoets TJ, Vukicevic S, Burger EH, D'Souza RN, *et al.* Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1, OP-1) and tooth development. **J Dent Res.** 1998 Apr; 77(4): 545-54.

44. Hill PA. Bone remodelling. **Br J Orthod**. 1998 May; 25(2): 101-7.
45. Hill PA, Tumber A, Meikle MC. Multiple extracellular signals promote osteoblast survival and apoptosis. **Endocrinology**. 1997 Sep; 138(9): 3849-58.
46. Hollinger J, Wong ME. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 1996 Dec; 82(6): 594-606.
47. Inoue T, Deporter DA, Melcher AH. Induction of chondrogenesis in muscle, skin, bone marrow, and periodontal ligament by demineralized dentin and bone matrix in vivo and in vitro. **J Dent Res**. 1986 Jan; 65(1): 12-22.
48. Isaksson S, Alberius P. Comparison of regenerative capacity elicited by demineralized bone matrix of different embryonic origins. **J Craniomaxillofac Surg**. 1992 Feb-Mar; 20(2): 73-80.
49. Ishidou Y, Kitajima I, Obama H, Maruyama I, Murata F, Imamura T, *et al*. Enhanced expression of type I receptors for bone morphogenetic proteins during bone formation. **J Bone Miner Res**. 1995 Nov; 10(11): 1651-9.
50. Itthagarun A, Wei SH, Wefel JS. The effect of different commercial dentifrices on enamel lesion progression: an in vitro pH-cycling study. **Int Dent J**. 2000 Feb; 50(1): 21-8.
51. Jin Y, Yang LJ. The relationship between bone morphogenetic protein and neoplastic bone diseases. **Clin Orthop**. 1990 Oct; (259): 233-8.

52. Junqueira JC, Mancini MN, Carvalho YR, Anbinder AL, Balducci I, Rocha RF. Effects of simvastatin on bone regeneration in the mandibles of ovariectomized rats and on blood cholesterol levels. **J Oral Sci.** 2002 Dec; 44(3-4): 117-24.
53. Katchburian E, Arana-Chavez VE. **Histologia e embriologia oral.** São Paulo: Medicina Panamericana, 1999.
54. Kawai T, Urist MR. Bovine tooth-derived bone morphogenetic protein. **J Dent Res.** 1989 Jun; 68(6): 1069-74.
55. Kim SG, Yeo HH, Kim YK. Grafting of large defects of the jaws with a particulate dentin-plaster of Paris combination. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 1999 Jul; 88(1): 22-5.
56. Kim SG, Chung CH, Kim YK, Park JC, Lim SC. Use of particulate dentin-plaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2002 Jan-Feb; 17(1): 86-94.
57. Knudsen GE, Bang G, Kristoffersen T. Implanting of allogenic demineralized dentin in human gingival tissue. **J Clin Periodontol.** 1974; 1(3): 153-9.
58. Lowry DR. Protein measurement with the folin-phenol reagent. **J Biol. Chem.** 1951; 19: 265-71.
59. Lundgren AK, Lundgren D, Sennerby L, Taylor A, Gottlow J, Nyman S. Augmentation of skull bone using a bioresorbable barrier supported by autologous bone grafts. An intra-individual study in the rabbit. **Clin Oral Implants Res.** 1997a Apr; 8(2): 90-5.

60. Lundgren AK, Sennerby L, Lundgren D, Taylor A, Gottlow J, Nyman S. Bone augmentation at titanium implants using autologous bone grafts and a bioresorbable barrier. An experimental study in the rabbit tibia. **Clin Oral Implants Res.** 1997 Apr; 8(2): 82-9.
61. Mandarim-de-Lacerda CA. **Métodos quantitativos em morfologia.** Rio de Janeiro: EdUERJ; 1995.
62. Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. **N Engl J Med.** 1995 Feb; 332(5): 305-11.
63. Martin TJ, Ng KW. Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity. **J Cell Biochem.** 1994 Nov; 56(3): 357-66.
64. Massague J. Transforming growth factor-beta modulates the high-affinity receptors for epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha. **J Cell Biol.** 1985 May; 100(5): 1508-14.
65. Mellonig JT, Prewett AB, Moyer MP. HIV inactivation in a bone allograft. **J Periodontol.** 1992 Dec; 63(12): 979-83.
66. Misch CE, Dietsh F. Bone-grafting materials in implant dentistry. **Implant Dent.** 1993 Fall; 2(3): 158-67.
67. Mundy GR. Peptides and growth regulatory factors in bone. **Rheum Dis Clin North Am.** 1994 Aug; 20(3): 577-88.
68. Murray G, Holden R, Roschlau W. Experimental and clinical study of new growth of bone in a cavity. **Am J Surg.** 1957 Mar; 93(3): 385-7.

69. Nade S. Stimulating osteogenesis. **Injury**. 1994 Nov; 25(9): 577-83.
70. Nakashima M. Induction of dentine in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and -4 with collagen matrix. **Arch Oral Biol**. 1994 Dec; 39(12): 1085-9.
71. Nakashima M. The induction of reparative dentine in the amputated dental pulp of the dog by bone morphogenetic protein. **Arch Oral Biol**. 1990a; 35(7): 493-7.
72. Nakashima M. Mitogenic and dentin-inductive effects of crude bone morphogenetic protein from bone and dentin in primary adult pulp cell culture. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. 1992 Apr; 73(4): 484-9.
73. Nakashima M. An ultrastructural study of the differentiation of mesenchymal cells in implants of allogeneic dentine matrix on the amputated dental pulp of the dog. **Arch Oral Biol**. 1990; 35(4): 277-81.
74. Nociti FH Jr, Machado MA, Stefani CM, Sallum EA, Sallum AW. Absorbable versus nonabsorbable membranes and bone grafts in the treatment of ligature-induced peri-implantitis defects in dogs. Part I. A clinical investigation. **Clin Oral Implants Res**. 2001 Apr; 12(2): 115-20.
75. Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. **J Clin Periodontol**. 1982 May; 9(3): 257-65.
76. Ogiso B, Hughes FJ, Melcher AH, McCulloch CA. Fibroblasts inhibit mineralised bone nodule formation by rat bone marrow stromal cells in vitro. **J Cell Physiol**. 1991 Mar; 146(3): 442-50.

77. Okamoto T, Túrcio KHL, Yoshino TY, Garcia IR Jr, Saito CTMH, Tanaka FY. Implante homogêneo de matriz dentinária conservada em glicerina a 98%: estudo microscópico em tecido conjuntivo subcutâneo de rato. **Revista da Faculdade de Ciências Odontológicas de Marília**. 1999; 2(2). Disponível em: URL: <http://www.unimar.br/publicacoes/revistafco/paginas/pag5.htm> [2000 Jan 20].
78. Pallesen L, Schou S, Aaboe M, Hjorting-Hansen E, Nattestad A, Melsen F. Influence of particle size of autogenous bone grafts on the early stages of bone regeneration: a histologic and stereologic study in rabbit calvarium. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 2002 Jul-Aug; 17(4): 498-506.
79. Pfeilschifter J, Bonewald L, Mundy GR. Characterization of the latent transforming growth factor beta complex in bone. **J Bone Miner Res**. 1990 Jan; 5(1): 49-58.
80. Pfeilschifter J, Wolf O, Naumann A, Minne HW, Mundy GR, Ziegler R. Chemotactic response of osteoblastlike cells to transforming growth factor beta. **J Bone Miner Res**. 1990 Aug; 5(8): 825-30.
81. Pinholt EM, Solheim E. Effect of storage on osteoinductive properties of demineralized bone in rats. **Ann Plast Surg**. 1994 Nov; 33(5): 531-5.
82. Rabie AB, Deng YM, Samman N, Hagg U. The effect of demineralized bone matrix on the healing of intramembranous bone grafts in rabbit skull defects. **J Dent Res**. 1996 Apr; 75(4): 1045-51.
83. Raval P, Hsu HH, Schneider DJ, Sarras MP Jr, Masuhara K, Bonewald LF, *et al*. Expression of bone morphogenetic proteins by osteoinductive and non-osteoinductive human osteosarcoma cells. **J Dent Res**. 1996 Jul; 75(7): 1518-23.

84. Reddi AH. Cell biology and biochemistry of endochondral bone development. **Coll Relat Res.** 1981 Feb; 1(2): 209-26.
85. Ripamonti U, Reddi AH. Periodontal regeneration: potential role of bone morphogenetic proteins. **J Periodontal Res.** 1994 Jul; 29(4): 225-35.
86. Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, Stern DF, Sporn MB. Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1985 Jan; 82(1): 119-23.
87. Rosen V; Thies RS. **The cellular and molecular basis of bone formation and repair.** Heidelberg: Springer; c1995.
88. Sasano Y, Kamakura S, Nakamura M, Suzuki O, Mizoguchi I, Akita H, et al. Subperiosteal implantation of octacalcium phosphate (OCP) stimulates both chondrogenesis and osteogenesis in the tibia, but only osteogenesis in the parietal bone of a rat. **Anat Rec.** 1995 May; 242(1): 40-6.
89. Schenk RK. Bone regeneration biologic basis. In: Buser D, Dahlin C, Schenk RK. **Guided bone regeneration in implant dentistry.** Chicago: Quintessence books; 1994. p.49-100.
90. Schliephake H, Dard M, Planck H, Hierlemann H, Stern U. SC Alveolar ridge repair using resorbable membranes and autogenous bone particles with simultaneous placement of implants: an experimental pilot study in dogs. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2000 May-Jun; 15(3): 364-73.
91. Schmitz JP, Schwartz Z, Hollinger JO, Boyan BD. Characterization of rat calvarial nonunion defects. **Acta Anat (Basel).** 1990; 138(3): 185-92.

92. Simões MRG. **Aplicação de enxertos ósseos liofilizados** [monografia]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 1997.
93. Smiler DG, Johnson PW, Lozada JL, Misch C, Rosenlicht JL, Tatum OH Jr, *et al.* Sinus lift grafts and endosseous implants. Treatment of the atrophic posterior maxilla. **Dent Clin North Am.** 1992 Jan; 36(1): 151-86; discussion 187-8.
94. Sovieiro VM, Souza IPR, Gama FVA. Proteínas dentinogênicas: uma nova tendência para realização de pulpotomia. **Rev Bras Odontol.** 1998; 55(6): 314.
95. Strates BS, Stock AJ, Connolly JF. Skeletal repair in the aged: a preliminary study in rabbits. **Am J Med Sci.** 1988 Oct; 296(4): 266-9.
96. Szachowicz EH. Facial bone wound healing. An overview. **Otolaryngol Clin North Am.** 1995 Oct; 28(5): 865-80.
97. Taga R, Stipp ACM. **Manual prático de morfometria ao microscópio óptico, planejamento e desenvolvimento de um experimento.** Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 1994.
98. Ten Cate AR. **Histologia bucal:** desenvolvimento, estrutura e função. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
99. Torres CRG, Carvalho JC, Valera MC, Araújo MAM. Materiais ósseo-indutores para o complexo dentino pulpar. **Rev Fac Odontol Sao Jose dos Campos.** 2000; 3(1): 88-96.

100. Tziafas D, Alvanou A, Panagiotakopoulos N, Smith AJ, Lesot H, Komnenou A, *et al.* Induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after in vivo implantation of dentine matrix components. **Arch Oral Biol.** 1995 Oct; 40(10): 883-93.
101. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. **Science.** 1965 Nov; 150(698): 893-9.
102. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. 1965. **Clin Orthop.** 2002 Feb; (395): 4-10.
103. Urist MR. Strates BS. Bone morphogenetic protein. **J Dent Res.** 1971 Nov-Dec; 50(6): 1392-406.
104. Veis A, Sires B, Clohisy J. A search for the osteogenic factor in dentin. Rat incisor dentin contains a factor stimulating rat muscle cells in vitro to incorporate sulfate into an altered proteoglycan. **Connect Tissue Res.** 1989; 23(2-3): 137-44.
105. Vieira S. **Estatística experimental.** 2.ed. São Paulo: Atlas; 1999.
106. Warshawsky H, Moore G. A technique for the fixation and decalcification of rat incisors for electron microscopy. **J Histochem Cytochem.** 1967 Sep; 15(9): 542-9.
107. Weibel ER. **Stereological methods: pratical methods for biological morphometry.** London: Academic Press; 1979.
108. Yeomans JD, Urist MR. Bone induction by decalcified dentine implanted into oral, osseous and muscle tissues. **Arch Oral Biol.** 1967 Aug; 12(8): 999-1008.

109. Yoshida T, Itoh T, Saitoh T, Sekine I. Histopathological study of the use of freeze-dried allogenic dentin powder and True Bone Ceramic as apical barrier materials. **J Endod.** 1998 Sep; 24(9): 581-6.
110. Zasacki W. The efficacy of application of lyophilized, radiation-sterilized bone graft in orthopedic surgery. **Clin Orthop.** 1991 Nov; (272): 82-7.

ANEXO 1

TABELA 3

Resultados Experimentais - Densidade de Volume de Matriz Óssea Neoformada em todos os campos histológicos dos animais experimentais, medidos aleatoriamente.

Grupos: Controle (A) e Tratado (B).
Períodos: 30 , 60 e 90 dias

A 30	A 60	A 90	B 30	B 60	B 90
0,574	0,926	0,722	0,593	0,648	0,630
0,370	0,815	0,500	0,568	0,586	0,784
0,407	0,352	0,574	0,617	0,654	0,728
0,556	0,241	0,685	0,617	0,568	0,772
0,222	0,315	0,500	0,691	0,605	0,852
0,426	0,204	0,556	0,642	0,543	0,895
0,056	0,574	0,759	0,605	0,562	0,870
0,111	0,870	0,537	0,568	0,512	0,877
0,074	0,815	0,648	0,605	0,617	0,827
0,796	0,407	0,444	0,519	0,549	0,617
0,463	0,648	0,500	0,512	0,642	0,790
0,463	0,500	0,389	0,543	0,667	0,698
0,296	0,333	0,556	0,519	0,654	0,753
0,685	0,222	0,093	0,315	0,611	0,790
0,019	0,370	0,778	0,549	0,667	0,759
0,519	0,519	0,500	0,525	0,611	0,722
0,074	0,463	0,556	0,623	0,772	0,821
0,111	0,315	0,352	0,568	0,716	0,772
0,426	0,926	0,056	0,840	0,722	0,568
0,463	0,648	0,463	0,796	0,642	0,685
0,407	0,352	0,074	0,543	0,691	0,654
0,167	0,333	0,093	0,790	0,605	0,741
0,296	0,315	0,019	0,691	0,648	0,772
0,056	0,370	0,167	0,673	0,586	0,741
0,130	0,574	0,056	0,778	0,636	0,747
0,426	0,463	0,556	0,463	0,574	0,753
0,333	0,815	0,148	0,605	0,710	0,704
			0,543		
			0,642		
			0,525		
			0,630		
			0,599		
			0,241		
			0,401		
			0,191		
			0,691		

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 001/2002-PA/CEP, sobre **“AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA REPARAÇÃO ÓSSEA COM O USO DA MATRIZ DENTINÁRIA HOMÓGENA LIOFILIZADA”**, sob a responsabilidade de **Valéria Abrantes Pinheiro Carvalho**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 21 de fevereiro de 2002.



Prof. Adj. PAULO VILLELA SANTOS JUNIOR
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa-Local